



**Universidade de
Aveiro**

2010

Departamento de Química

**Eunice Marujo
Branco**

**Estudo da Migração do Ferro das Latas para a
Cerveja**



**Universidade de
Aveiro**

2010

Departamento de Química

**Eunice Marujo
Branco**

Estudo da Migração do Ferro das Latas para a Cerveja

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Controlo de Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra Dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha falecida avó Maria, pela educação, apoio e amor que sempre me deu ao longo da sua vida.

O júri

Presidente

Prof. Doutor João António Baptista de Oliveira

Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes

Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria da Conceição Vaz Angélico

Professora adjunta do Departamento de Ambiente e Recursos Naturais da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança

Agradecimentos

Quero agradecer à Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes pela orientação, disposição, atenção, carinho, afecto e compreensão demonstradas durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Saliento ainda o seu espírito crítico, a assertividade, uma direcção eficaz, que se revelou numa grande apetência pedagógica, importantes para a finalização deste trabalho.

À Dra. Maria Teresa Matos Caldeira, Técnica do Laboratório de Química Analítica da Universidade de Aveiro, agradeço pela sua disponibilidade que me permitiu adquirir conhecimentos práticos no que diz respeito ao uso de instrumentos de Absorção Atómica. Posso ainda salientar o incentivo e confiança que depositou em mim.

Ao Doutor João António Baptista de Oliveira pela atenção e ajuda que sempre disponibilizou ao longo do trabalho.

À minha mãe Isilda e à minha tia Rosa Maria, pelo incentivo e compreensão. Ao Gregório e à Carlota, pela preocupação e amabilidade demonstrada. Ao Wassath Kylwange pelo amor e apoio e aos meus amigos e colegas da Universidade de Aveiro, Patrícia Santos, Fernando Casqueira, Bruno Moreira, Vera Antunes, Marta Veríssimo e Nuno Valente, pela constante presença, ajuda e motivação.

Resumo

Este trabalho consistiu na análise do ferro da cerveja em lata, de dois lotes L3309092 (embaladas em Março 2009) e o L3317771 (embaladas em Março 2007).

Analisando a cerveja das latas ao longo de 581 dias, não se detectou migração do ferro para a cerveja do lote L3309092, pois nas análises feitas os valores de concentração de ferro não são significativamente diferentes ao longo deste tempo e são valores que estão abaixo do limite máximo recomendado (0,1 ppm).

Algumas das latas do lote L3309092 foram amolgadas, tendo sido o seu conteúdo analisado ao longo do tempo. Relativamente, às latas amolgadas do lote L3309092, também não se detectou diferença na concentração do ferro ao longo do tempo, excepto para as amostras com tempo de armazenamento de 299, 580 e 581 dias em que a concentração de ferro ultrapassou o limite máximo recomendado. Concluiu-se que as concentrações de ferro na cerveja para estas latas não dependem do tempo de armazenamento mas sim do tipo de agressão feito à folha-de-flandres da lata. Nas latas amolgadas cuja agressão feita na folha-de-flandres não danificou o revestimento interior, as concentrações de ferro obtidas na cerveja são da mesma ordem de grandeza que nas latas normais. Já naquelas em que se notou pontos de corrosão que permitiu o contacto da cerveja com a camada metálica, o teor de ferro era maior. Pode-se dizer que se a lata de cerveja não sofrer nenhum tipo de agressão a sua qualidade no que diz respeito à presença de ferro não é alterada pelo menos durante 581 dias.

As latas do lote L3317771 têm maior tempo de armazenamento que as latas do lote L3309092 e também evidenciaram teores de ferro maiores, ultrapassando o limite máximo recomendado. No entanto, o tempo de armazenamento pode não justificar os valores de concentração de ferro encontrados. Uma vez que essa cerveja foi produzida e embalada dois anos antes, não é de excluir a hipótese do revestimento das latas ser diferente.

Keywords

Beer, Iron, Tinplate

Abstract

This work consisted in the analysis of iron from beer cans, from two distinct lots L3309092 (canned in March 2009) and L3317771 (canned in March 2007).

Along 581 days there was no detectable migration of iron from the normal beer cans of the lot L3309092. The iron concentration of beer from the cans was not significantly different during this time and the values were below the recommended maximum limit (0,1 ppm).

Some of the cans from the lot L3309092 were dented, having their content been analyzed over time. No difference in iron concentration over time was found in the beer of these dented cans, except for the samples with storage time of 299, 580 and 581 days, where the iron concentration exceeded the recommended maximum limit. It was concluded that iron concentration in these dented beer cans doesn't depend on the storage time but on the type of aggression that was made over the tinplate of the can. The dented cans whose aggression made in the tinplate did not damage the inner lining, showed to contain beer with iron concentrations similar to the non damaged cans. In those where there were contact points between beer and the metal layer, the iron concentrations were higher. It can be said that if the can didn't suffer any kind of aggression, the beer quality in respect to the presence of iron remains constant for at least 581 days.

The beer from the lot L3317771 exceeded the recommended maximum limit of iron, because the beer cans had the longer storage time. However, the storage time may not justify the concentration values of iron found. Inasmuch as the production and packaging of the beer took place two years before, it could not be ruled out that the lining of cans is different.

Índice Geral

Índice Geral.....	i
Índice de Figuras	iv
Índice de Tabelas	vi
1. Material das Latas.....	1
1.1. Folha-de-flandres	2
1.1.1. Revestimentos aplicados à folha-de-flandres.....	4
1.1.2. Fabrico da Lata a partir da folha-de-flandres.....	5
1.1.3. Corrosão das latas.....	8
1.2. Interação da embalagem e o alimento	10
1.2.1. Migração do Estanho da Lata para o Produto Alimentar.....	11
1.2.2. Migração do Ferro da Lata para o Produto Alimentar.....	13
2. Cerveja.....	15
2.1. Produção da Cerveja	16
2.2. Espuma da Cerveja	18
2.3. Coloração da Cerveja.....	20
3. Ferro na Cerveja.....	22
3.1. Fontes de Metais na Cerveja.....	23
3.2. Efeito dos Metais na Cerveja	25
3.2. Importância do Ferro no Organismo.....	28
4. Fundamentos dos Métodos utilizados.....	30
4.1. Métodos Analíticos mais utilizados na Determinação do Ferro na Cerveja.....	31
4.2. Determinação do Ferro na Cerveja através da Espectroscopia de Absorção Atómica.....	31
4.2.1. Interferentes da Absorção Atómica.....	34

4.2.2.	Tratamento Prévio da Amostra de Cerveja para Determinação do Ferro por Absorção Atômica.....	36
4.3.	Determinação do Ferro na Cerveja através Espectroscopia de Absorção Molecular UV-VIS (Método Colorimétrico da o-fenantrolina)	37
4.3.1.	Interferentes.....	39
5.	Materiais e Métodos.....	41
5.1.	Material.....	42
5.2.	Reagentes	42
5.3.	Amostras de Cerveja.....	43
5.4.	Instrumentos de Laboratório	43
5.5.	Preparação de Soluções e da Amostra de Cerveja.....	43
5.5.1.	Preparação da orto-fenantrolina a 0,3%	43
5.5.2.	Preparação da Amostra de Cerveja.....	44
5.5.3.	Preparação das Soluções a usar no Método da Adição Padrão.....	44
5.6.	Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina.....	46
5.6.1.	Cálculo da Concentração de Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina.....	48
5.7.	Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método FAAS.....	49
5.7.1.	Digestão Ácida da Cerveja.....	49
5.7.2.	Recta de Calibração do Método FAAS e Determinação do Ferro na Amostra de Cerveja	50
5.8.	Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método GFAAS.....	51
5.8.1.	Análise do Ferro da Cerveja Digerida pelo Método GFAAS.....	51
5.8.2.	Análise do Ferro da Cerveja Diluída pelo método GFAAS.....	53

6.	Resultados e Discussão.....	55
6.1.	Análise do Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina.....	56
6.1.1.	Seleção do Comprimento de Onda.....	56
6.1.2.	Estudo da Estabilidade da Cor ao Longo do Tempo.....	57
6.1.3.	Análise do Ferro na Cerveja ao Longo do Tempo.....	58
6.2.	Análise do Ferro na Cerveja por Espectroscopia de Absorção Atômica ...	64
7.	Conclusão.....	69
8.	Referências.....	71

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura da folha-de-flandres (adaptado de [5]).	3
Figura 2: Representação esquemática do fabrico de: latas com três peças (a), latas com duas peças, com pouca profundidade (b), latas com duas peças, com profundidade e pequenas (c), latas com duas peças, com profundidade e diâmetro pequeno no corpo da lata (adaptado de [5]).	6
Figura 3: Dupla-costura das latas: vista da costura (a). Costura depois da primeira operação (b) Costura depois da segunda operação (c) (adaptado de [5]).	7
Figura 4: Esquema simplificado de um diagrama de produção de cerveja (adaptado de [30]).	17
Figura 5: Imagens da flor de lúpulo [31].	18
Figura 6: Estrutura do ácido iso- α com um catião metálico [22].	19
Figura 7: Reacções de produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na cerveja (adaptado de [42]).	28
Figura 8: Representação gráfica do perfil do programa de temperaturas para o forno de grafite : (1) secagem; (2) pré-tratamento termal (incineração); (3) atomização; (4) limpeza; (5) arrefecimento (adaptado de [49]).	33
Figura 9: Representação gráfica do comportamento da Absorvência em função da temperatura de Incineração: (A) elemento; (B) elemento + modificador químico (adaptado de [51]).	34
Figura 10: Esquema do complexo de 3 ligantes de fenantrolina e o ferro (II) assim como as absorvências do complexo (com Fe (II) e Fe (III)) (adaptado de [57]).	38
Figura 11: Fotografia do método de desgaseificar a cerveja em vácuo neste trabalho.	44
Figura 12: Esquema ilustrativo da preparação dos balões de cerveja com padrão de ferro.	45
Figura 13: Espectro do complexo corado, com comprimento de onda máximo de 511,00 nm.	56

Figura 14: Representação gráfica da concentração do ferro na cerveja do lote L3309092 em função do tempo.	60
Figura 15: Fotografia do interior da lata amolgada (a) e normal (b) com 299 dias.....	62
Figura 16: Representação gráfica dos espectros para a cerveja diluída 20 x do lote L3309092 e do lote L3317771.	64
Figura 17: Representação gráfica da concentração de ferro na amostra 1 e 2 de cerveja em três métodos distintos: UV-Vis, FAAS e GFAAS.	65
Figura 18: Representação gráfica da concentração de ferro em 5 amostras distintas de cerveja pelo método UV-Vis e GFAAS.	67

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição química do estanho utilizado na folha-de-flandres [8].	4
Tabela 2: Valores de ferro obtidos em amostras de cerveja enlatada, de diferentes fontes bibliográficas.	13
Tabela 3: Quantidade de ferro nos diferentes tipos de cereais: cevada, trigo, milho e arroz (adaptado de [29]).	17
Tabela 4: Principais contribuintes químicos da cor da cerveja [22].	20
Tabela 5: Requerimentos essenciais da qualidade da água utilizada na produção de cerveja (adaptado [22]).	24
Tabela 6: Passos e procedimentos para a lavagem do material.	42
Tabela 7: Tabela de concentrações finais de ferro nos balões de cerveja com padrão de ferro.	46
Tabela 8: Volume de solução a retirar dos balões de cerveja com padrão de ferro para os copos.	47
Tabela 9: Volume de reagente de cor (ou água Milli-Q) a adicionar a cada copo.	47
Tabela 10: Valores de concentração final de ferro nos copos de análise de cerveja.	48
Tabela 11: Preparação da Solução-mãe de ferro (1 ppm) a partir de uma solução padrão de 1000 ppm.	50
Tabela 12: Preparação dos padrões de ferro a utilizar na recta de calibração do método FAAS a partir da solução-mãe de 1,00 ppm, para balões volumétricos de 20,00 mL.	51
Tabela 13: Programa de temperaturas na câmara de grafite, para amostras de cerveja digeridas.	52
Tabela 14: Concentrações de ferro a escolher no programa: método e sequência, a partir de uma solução-mãe de 50 ppb.	52

Tabela 15: Programa de temperaturas na câmara de grafite, para análise directa de amostras de cerveja.	53
Tabela 16: Concentrações de ferro a escolher no programa: método e sequência, a partir de uma solução-mãe de 100 ppb.	54
Tabela 17: Registo das absorvências a 511,00 nm de uma solução de cerveja com 2,22 ppm de ferro adicionado ao longo do tempo, após a adição do reagente de cor.	57
Tabela 18: Tabela resumo das análises do ferro na cerveja ao longo do tempo.....	59
Tabela 19: Tabela resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises: UV-Vis, FAAS e GFAAS.	65
Tabela 20: Tabela resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises: UV-Vis e GFAAS.	66

1. Material das Latas

A evolução da indústria alimentar conduziu à mudança e ao progresso das embalagens dos alimentos/bebidas, de modo a alongar o prazo e qualidade do produto alimentar. Por definição, embalagem é “o conjunto de materiais destinados a proteger um produto que deve ser transportado” [1]. É importante referir que as funções básicas da embalagem estão relacionadas com a protecção física do produto [2]. A embalagem deverá ser um elemento versátil, eficiente, que garanta a disponibilidade e a qualidade do produto em qualquer lugar. O requisito indispensável que o consumidor procura nas embalagens alimentares é a segurança, ou seja, a embalagem deve ser inviolável e o produto deve estar íntegro no momento da compra [3].

A lata poderá satisfazer os requisitos anteriormente referidos para as embalagens, pois contém o alimento e protege-o dos factores extrínsecos de deterioração, como exemplo o oxigénio, a luz e os microrganismos. Contudo, existe a possibilidade de interacção entre a embalagem e o alimento [4].

1.1. Folha-de-flandres

A folha-de-flandres é um material metálico, geralmente utilizado para o fabrico de latas de comida ou bebida. A folha-de-flandres é constituída por ferro e aço com um baixo teor de carbono, e revestida de ambos os lados com uma camada de estanho. A folha ou tira de aço apresenta geralmente 0,50-0,15 mm de espessura e o revestimento de estanho raramente excede 1% da espessura total da folha-de-flandres. Na Figura 1 mostra-se um esquema da constituição da folha-de-flandres [5].

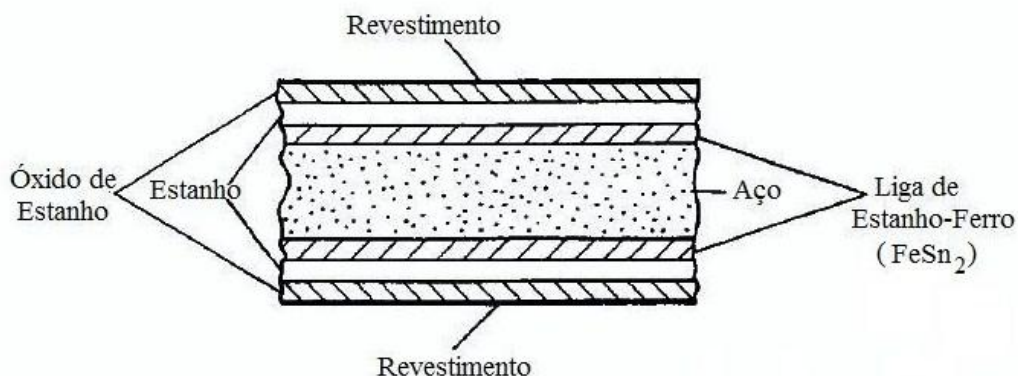


Figura 1: Estrutura da folha-de-flandres (adaptado de [5]).

O estanho é aplicado nos dois lados da liga de aço e podem ser aplicadas diferentes espessuras de estanho a cada lado da liga consoante o tipo de alimento que vai estar em contacto com a folha-de-flandres e consoante as agressões que podem ser causadas pelo meio externo [6].

As características de resistência mecânica e fabricação da folha-de-flandres dependem do tipo de aço e sua espessura [5]. O aço possui uma natureza relativamente complexa, composta por ferro-carbono, contendo geralmente menos de 1,7% de carbono, assim como elementos residuais, resultantes dos processos de fabricação [7]. Os constituintes em menor quantidade do aço são o carbono, o manganésio, o fósforo, o silício, o enxofre e o cobre [5].

Na Tabela 1, podem-se observar os constituintes encontrados no estanho, utilizado na folha-de-flandres.

Tabela 1: Composição química do estanho utilizado na folha-de-flandres [8].

Elemento	Composição %
Sn	99,85 mínimo
Al	0,0010 máximo
As	0,030 máximo
Bi	0,030 máximo
Cd	0,0010 máximo
Cu	0,050 máximo
Fe	0,010 máximo
Pb	0,050 máximo
Sb	0,050 máximo
Zn	0,0010 máximo
Total impurezas	0,150 máximo

A resistência à corrosão da folha-de-flandres depende do revestimento da camada de estanho e em geral, quanto mais corrosivo for o produto alimentar maior será o peso do revestimento utilizado [5]. Em suma, as principais características da folha-de-flandres são: a resistência mecânica, a capacidade de conformação e a resistência à corrosão [3].

1.1.1. Revestimentos aplicados à folha-de-flandres

Os revestimentos orgânicos são utilizados para fornecer uma protecção adicional em relação à que já é oferecida pela própria folha-de-flandres. Deve haver um controlo da quantidade de revestimento aplicado à folha-de-flandres devido ao peso e espessura que a película pode formar [9]. Um revestimento mais pesado pode ser benéfico, visto que se forma uma película mais uniforme, consequentemente um revestimento mais homogéneo [10].

O revestimento das latas não pode ser tóxico e deve ser livre de odores e sabores. Este revestimento deve resistir à operação mecânica da produção das latas, deve fornecer uma barreira entre o produto embalado e a liga metálica, e se possível, e por conveniência ao fabricante, deve ser económico. [9].

Os revestimentos têm vários propósitos. Eles permitem uma redução no custo dos materiais, tais como aços caros. Eles protegem o aço da corrosão e impedem o contacto do aço com o interior (interacção com o produto alimentar) e com exterior da embalagem (que minimiza a oxidação), servindo também como um suporte que melhora a adesão para a litografia; A litografia consiste num processo de impressão, que tem como principal objectivo a publicidade, que vai distinguir o produto no comércio [9].

Os revestimentos da folha-de-flandres podem ser opcionais, dependendo do produto que vai ser acondicionado no recipiente e das condições ambientais externas [6]. Contudo, geralmente a folha-de-flandres tem um revestimento duplo ou até mesmo triplo [9].

1.1.2. Fabrico da Lata a partir da folha-de-flandres

Nenhum outro recipiente tem os atributos da lata: económica, resistente, com grande durabilidade, sem sabor ou odor, de fácil manipulação, compacta, leve, evita o dano causado pela luz e pode proporcionar uma vedação hermética [9].

As latas podem ter qualquer tipo de formato e o processo de dar forma à lata designa-se por Processo “Stretching”. Para além da produção de vários formatos, este processo permite a formação da tampa das latas. A tampa é uma extremidade que utiliza uma menor quantidade de matéria-prima além de possibilitar o empilhamento das latas, entre a tampa e o fundo [3].

As latas podem ser classificadas de acordo com a matéria-prima utilizada. Existem dois tipos de latas encontradas no mercado: latas de alumínio e latas de aço (folha-de-flandres) [3].

Consoante o processo de fabricação, as latas podem ser divididas em dois grupos:

- Latas de três peças:

Estas latas são constituídas por corpo, tampa e fundo. O seu formato é geralmente cilíndrico, contudo outros formatos podem ser utilizados como rectangulares ou diferenciados [3]. As três peças da lata são feitas separadamente, o corpo da lata e as duas

extremidades. Primeiro uma extremidade é aplicada ao corpo da lata e só depois da lata estar cheia com produto alimentar é que a outra extremidade é aplicada. As bordas das extremidades são enroladas e presas ao corpo da lata com um composto de vedação. O corpo da lata é cortado da folha de metal e forma uma estrutura cilíndrica em que a costura lateral é selada por solda ou uma cola. Ambas as extremidades podem ter diferentes rebordos consoante a aplicação da lata (Figura 2 a). As extremidades das latas são aplicadas ao corpo por meio de uma dupla-costura, Figura 3 (a). O mandril (instrumento de alisar e dobrar [11]) roda rapidamente para prender as extremidades ao corpo da lata. Primeiro forma-se uma emenda, onde se junta o corpo da lata e a extremidade, onde o mandril roda para fora (Figura 3 b) e de seguida, no segundo movimento, o mandril roda para dentro (Figura 3 c), apertando a emenda e terminando a costura [5].

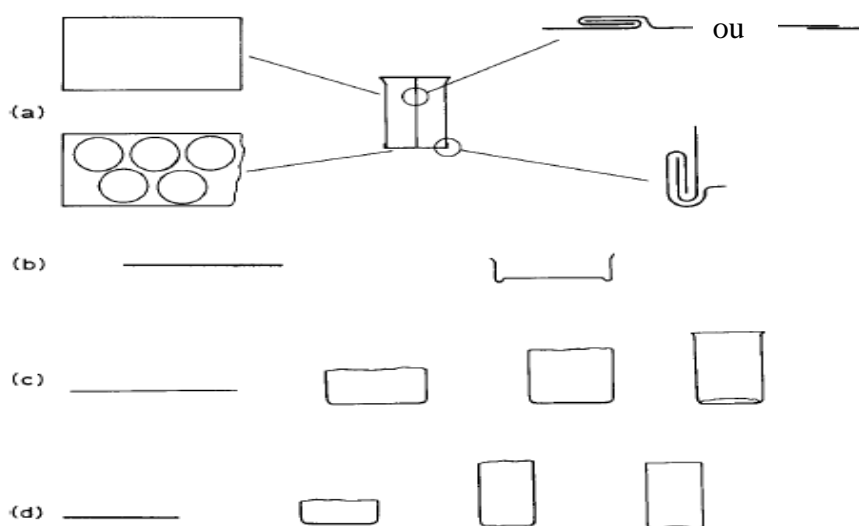


Figura 2: Representação esquemática do fabrico de: latas com três peças (a), latas com duas peças, com pouca profundidade (b), latas com duas peças, com profundidade e pequenas (c), latas com duas peças, com profundidade e diâmetro pequeno no corpo da lata (adaptado de [5]).

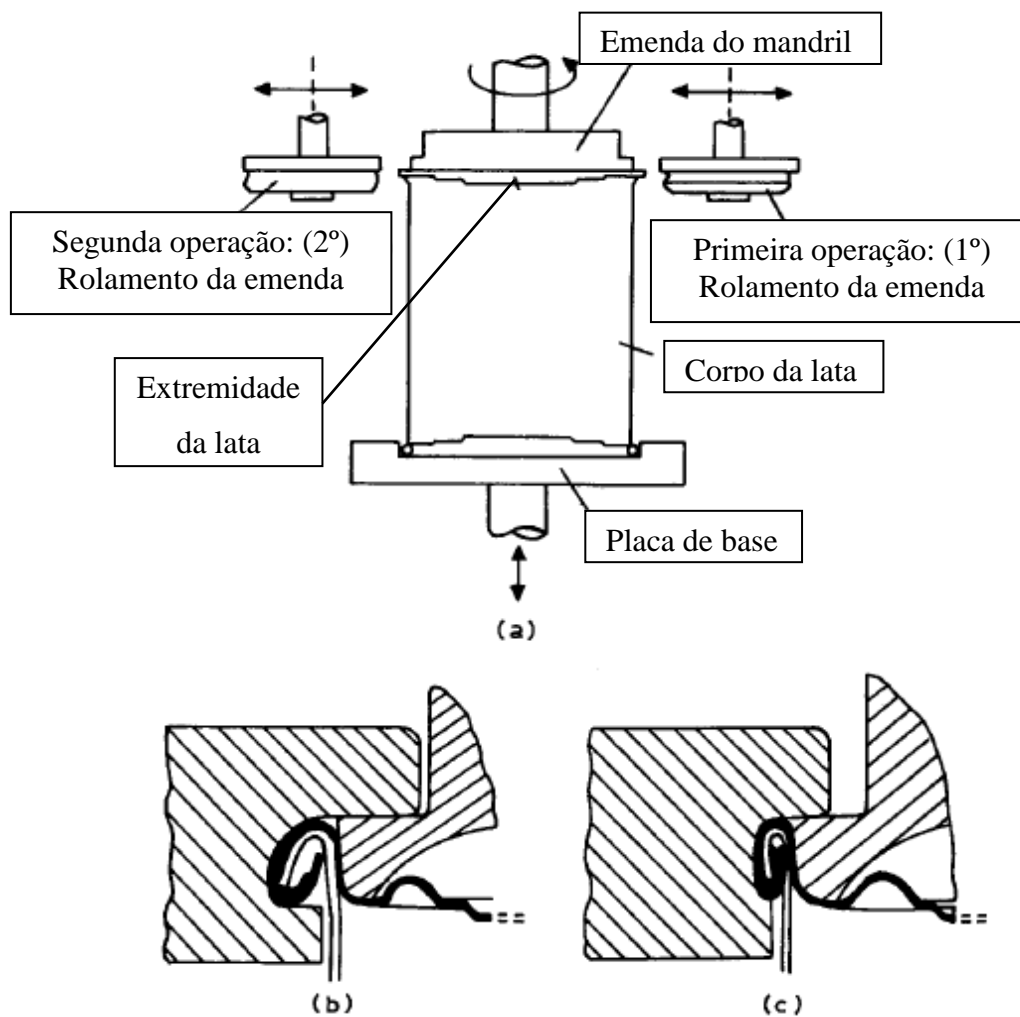


Figura 3: Dupla-costura das latas: vista da costura (a). Costura depois da primeira operação (b) Costura depois da segunda operação (c) (adaptado de [5]).

- Latas de duas peças:

Estas latas são constituídas apenas pela tampa e pelo corpo. A principal característica deste tipo de lata é não possuir a costura ou a solda lateral [3].

O corpo e base da lata são feitos em apenas uma operação através da folha de metal. A parte final aberta do corpo da lata tem um rebordo saliente, a extremidade é aplicada a este rebordo, por meio de dupla-costura, depois da lata estar cheia de produto alimentar. Por causa da tensão feita sobre o metal, estas latas têm pouca profundidade, e portanto têm uma altura máxima: a relação altura:diâmetro de 1:2 (Figura 2 b) [5].

Existem latas de duas peças mais profundas que as anteriores. São feitas por um desenho de um copo com um diâmetro menor em uma série de estágios para produzir um recipiente mais profundo. Estas latas são relativamente pequenas, cilíndricas e com altura: a relação altura:diâmetro de 1,2:1,0 (Figura 2 c) [5].

Ainda existem latas idênticas às anteriormente referidas, mas feitas a partir de um disco metálico com 0,30-0,42 mm de espessura. Este tipo de lata, é feito a partir de um copo de baixa profundidade que passa por uma série de anéis levando à redução de diâmetro interno de modo à parede do corpo ficar mais fina e mais alta (Figura 2 d). Por causa da parede do corpo da lata ser fina, normalmente 0,10 mm de espessura, estas latas são usadas principalmente para bebidas gaseificadas, pois a pressão interna suporta a parede fina [5].

1.1.3. Corrosão das latas

A corrosão nas latas manifesta-se em fenómenos como a falta de estanho na folha-de-flandres, o aumento de hidrogénio e a danificação do revestimento e estes fenómenos têm trazido uma preocupação crescente à Indústria Alimentar [9].

Existem muitos indicadores de fenómenos corrosivos que envolvem a actividade do hidrogénio e a principal fonte de hidrogénio é a água. O estudo da corrosão é baseado nas reacções oxi-redução, onde o hidrogénio está envolvido [9].

A adesão do revestimento na lata é baseada em pontes de hidrogénio em que o átomo de hidrogénio do revestimento orgânico partilha o seu electrão com o metal da lata. Por exemplo, o átomo de hidrogénio de um grupo OH do revestimento pode partilhar o seu electrão com um átomo de oxigénio na superfície do metal. A ligação de hidrogénio pode ser descrita como METAL-O \cdots H \cdots O-POLIMERO. Esta ligação pode ser destruída por um mecanismo de redução, pela adição de um átomo de hidrogénio à ligação, que dará lugar à repulsão entre os dois grupos OH [9].

No caso da falta de estanho nas latas, o estanho da folha-de-flandres pode ter sido oxidado devido à presença do hidrogénio proveniente da água. A oxidação dos produtos

alimentares em latas manifesta-se na alteração do sabor e da cor, o que pode ser explicado devido à perda de hidrogénio. A oxidação de metais é geralmente definida pela perda de electrões [9].

No processo de corrosão da folha-de-flandres de uma lata, o metal é geralmente oxidado, e o produto é reduzido [9].

O recipiente de aço não é quimicamente inerte e portanto, pode reagir com o seu ambiente e o seu conteúdo. O aço é o componente principal da folha-de-flandres e o ferro presente no aço é um metal quimicamente activo que prontamente toma parte nas reacções que envolvem água, oxigénio, ácidos e uma série de elementos e compostos que podem participar nas reacções de oxidação e redução. A aplicação de estanho à superfície da folha-de-flandres aumenta significativamente a resistência à corrosão do aço [9, 12]. No entanto, o potencial ao ataque de corrosão persiste. O ataque de corrosão depende sempre de [9]:

- Diferenças de potencial entre áreas adjacentes sobre a superfície metálica exposta, para fornecer ânodos e cátodos.
- Humidade, para providenciar um electrólito.
- Um agente, para ser reduzido no cátodo e outro para ser oxidado no ânodo.
- Uma trajectória eléctrica do metal, para o fluxo de electrões passar de ânodos para os cátodos.

Em condições normais, o estanho forma o ânodo do conjunto, que vai passando para a solução a uma velocidade extremamente lenta. O estanho providencia alguma protecção para o produto alimentar embalado. Sob a influência de algumas condições e em resultado da falha que possa existir no revestimento de estanho da folha-de-flandres, o ferro pode formar um ânodo. Esta falha pode existir em resultado de uma perfuração ou descontinuidades na lata. Outras condições, como a presença de agentes de oxidação (como os nitratos) fazem com que a remoção do estanho seja altamente acelerada e consequente o tempo de vida da lata é reduzido [9].

1.2. Interacção da embalagem e o alimento

O contacto da embalagem com alimentos ácidos é caracterizado pela dissolução dos metais que constituem a embalagem, principalmente o ferro e o estanho uma vez que a folha-de-flandres é constituída por estes metais. No processo corrosivo dá-se a evolução do hidrogénio. É importante referir que como o próprio alimento, a embalagem metálica tem o seu tempo de vida útil definido [4].

A literatura técnica especializada utiliza o termo de “vida-de-prateleira”, que representa o tempo de vida útil do produto alimentar enlatado, durante o qual se mantêm as suas características sensoriais, tais como a cor, o sabor, a consistência e o seu valor nutricional sem que se perca a integridade da embalagem [4].

Durante muitos anos a concentração de estanho e chumbo presentes nos alimentos devia ser controlada e existiam limites máximos estabelecidos. Contudo, com os avanços tecnológicos, ambos os limites perderam a sua importância. No caso do chumbo, houve a substituição da solda lateral à base de liga estanho/chumbo pelas latas soldadas electricamente. No caso do estanho, as latas passaram a ser envernizadas internamente. Desta forma, outros parâmetros se tornaram mais importantes [4].

As latas não envernizadas, conhecidas como latas brancas, podem ser utilizadas em alimentos ditos “pouco agressivos”. É de referir que este tipo de alimentos beneficiam da presença de estanho dissolvido para a manutenção das suas características sensoriais, tais como a cor, embora não tenha sido esclarecido o mecanismo de actuação dos iões de estanho como inibidor das reacções que causam o escurecimento. Vegetais e frutos como o cogumelo, abacaxi, pêra, aspargo, palmito, pêsego, entre outros, podem sofrer um escurecimento, devido à sua sensibilidade na presença de ferro, o que altera o seu sabor e acelera o escurecimento [4].

Pode ser aplicado à folha-de-flandres uma laca (ou esmalte) para evitar a interacção indesejável entre o produto e o recipiente, designado por revestimento. Como exemplo das interacções relativamente aos produtos sensíveis a pequenas quantidades de estanho, temos a cerveja, que utiliza um revestimento de polibutadieno (resina de hidrocarbonetos) [5].

Nas latas envernizadas, a interação produto/embalagem dá-se principalmente nas descontinuidades do revestimento orgânico, onde o teor de ferro dissolvido no alimento passa a ser de maior interesse. O ferro presente nos alimentos para além de contribuir para o escurecimento do alimento, também pode conferir um sabor metálico e desagradável [4].

Relativamente ao ferro presente nos alimentos, a sensibilidade do alimento em relação à possibilidade de alteração de sabor e cor devido à presença de iões ferro varia de produto para produto e o potencial de migração destes iões depende também das características da folha-de-flandres utilizada e do seu envernizamento [4].

1.2.1. Migração do Estanho da Lata para o Produto Alimentar

O estanho pode não evitar completamente a corrosão da liga metálica utilizada nas embalagens alimentares, deste modo, pode dar-se um especial interesse à análise de estanho em diferentes tipos de alimentos enlatados. A presença de estanho nos alimentos não processados tem geralmente níveis inferiores a 1 mg/kg. Uma vez que, o estanho é utilizado como revestimento das latas de aço para alimentos e bebidas, podem ser encontradas maiores concentrações de estanho em alimentos enlatados, pela dissolução da folha-de-flandres para formar compostos inorgânicos de estanho ou complexos [12].

Existe um limite máximo para o estanho na forma inorgânica nos alimentos enlatados de 200 mg/kg, assim como para as bebidas de lata de 100 mg/kg e para alimentos líquidos enlatados para crianças pequenas de 50 mg/kg, uma vez que elevadas concentrações de estanho podem irritar os olhos, a pele, o trato digestivo, dar dor de cabeça e estômago e pode ainda provocar sudorese intensa, entre outros problemas [12, 13].

Vários métodos analíticos podem ser aplicados na determinação do estanho, tais como a colorimetria, voltametria, espectrometria de emissão atômica (AES) e espectrofotometria. Todos estes métodos necessitam que o alimento enlatado seja previamente digerido, por meio de uma mistura de ácidos concentrados, o principal problema é que o estanho é difícil de digerir mesmo com misturas muito concentradas de ácido, o que leva a uma leitura inadequada do teor de estanho no alimento [12].

O estanho quando ingerido em doses elevadas, ou seja 4,4-6,7 mg(Sn)/kg pode induzir sintomas gastrointestinais agudos como a distensão abdominal e a dor, sendo a ingestão semanal tolerável de estanho fixada em 14 mg/kg (de peso corporal). Quando o estanho é ingerido por via oral, ele é absorvido no trato gastrointestinal o que implica o estanho ser excretado pelas fezes e não pela urina. No entanto, a informação sobre este elemento é praticamente nenhuma. A determinação de estanho fornecida por alimentos embalados foi feita neste trabalho de Shimbo *et al* (2007) através de ICP-MS (Espectroscopia de Massa com fonte de Plasma com Acoplamento por Indução), com uma digestão ácida prévia das amostras (porções homogêneas) das embalagens metálicas. Estes estudos mostraram que o consumo de alimentos em conserva leva ao aumento substancial da ingestão dietética de estanho. A média da ingestão dietética para consumidores de alimentos enlatados é de 35,7 mg/dia, um valor oito vezes maior que a média da ingestão dietética para não consumidores de alimentos enlatados (4,5 mg/dia). Assumindo ainda que o peso corporal de um adulto tem uma média de 60 kg, o valor médio de estanho ingerido numa semana seria de 0,7 mg/kg, o que é substancialmente inferior aos 14 mg/kg toleráveis [14].

Várias inter-comparações recentes e exercícios de certificação mostraram que a determinação de estanho em amostras de alimentos é bem complicada. A análise instrumental de activação de neutrões oferece um controlo intrínseco da qualidade na determinação do teor de estanho. Contudo, o estanho é encontrado em baixos teores não ultrapassando 2 mg/kg. Os estudos realizados por Vermaercke *et al* (2009) mostraram que dos alimentos enlatados (pasta de pimentão, leite de coco, ananás, mistura de frutos, cenouras e alcachofras) apenas algumas amostras de alcachofras excediam o limite máximo tolerado para o estanho. É importante referir que o teor de estanho nos diferentes alimentos depende muito do tipo de envernizamento que as embalagens contêm, pois não houve correlação entre o teor de estanho presente na lata com o estanho presente nos alimentos analisados [12].

A presença de vestígios de estanho na cerveja, devido à interacção de superfícies de estanho e a cerveja, pode tornar a cerveja turva. A intensidade da turvação produzida na cerveja parece ser proporcional à quantidade de estanho envolvido. Tão pouco quanto 0,1 ppm de estanho pode afectar a clareza da bebida [15].

Como não existe nenhum método específico para a determinação de estanho na cerveja [16], Stone (1941) desenvolveu um método com a finalidade de determinar o estanho presente na cerveja. Contudo, Stone (1941) verificou que as cervejas davam um teste negativo na determinação do estanho [15].

1.2.2. Migração do Ferro da Lata para o Produto Alimentar

Ao contrário do estanho presente nas embalagens metálicas, o ferro é um constituinte maioritário das folhas-de-flandres, estando ele presente no aço e no próprio estanho. Deste modo, pode haver uma interação prejudicial à qualidade final do alimento embalado, devido à migração do ferro presente na embalagem metálica para o produto alimentar [4, 5, 7, 9].

Na Tabela 2, observam-se alguns estudos feitos na determinação do ferro de cervejas em lata. Relativamente ao ferro permitido na cerveja, de modo a não haver alterações na sua qualidade (ou seja, sem alteração da cor ou sabor metálico que o ferro presente na folha-de-flandres pode conferir à cerveja [4]), é recomendado um limite máximo de 0,1 ppm de ferro [17].

Tabela 2: Valores de ferro obtidos em amostras de cerveja enlatada, de diferentes fontes bibliográficas.

Tipo de cerveja	Concentração	Unidades	Método	Fonte
Cerveja Clara	58 ± 2	µg L ⁻¹	GFAAS	Svendsen <i>et al</i> (2000) [18]
Cervejas (n=25)	0,05-0,55	mg L ⁻¹	AS	Oñate-jaén <i>et al</i> (2006) [19]
Cerveja Polaca	16 ± 1	ngmL ⁻¹	AA*	Matusiewicz <i>et al</i> (1997) [20]
Cerveja Polaca	0,208-0,345	mg L ⁻¹	SPE-FAAS* ¹	Pohl <i>et al</i> (2010) [21]

* AA: Absorção Atômica com aprisionamento de átomos (Atom trapping flame atomic absorption)

*¹ SPE-FAAS: Extração de fase sólida e FAAS

Portanto, como se pode observar na Tabela 2, existem amostras de cerveja que excedem o limite máximo recomendado. Todos os factores, desde as fontes de ferro que levam a sua presença na própria cerveja e o tipo de revestimento que é feito na lata, para não permitir a sua corrosão e deste modo a migração do ferro da folha metálica para a cerveja, são importantes pois a cerveja actual portuguesa pode ter uma degradação na sua qualidade durante o armazenamento. Ou seja, o seu estudo é de especial interesse devido à grande competitividade que existe no mercado.

2. Cerveja

A cerveja tem sido uma bebida popular durante milhares de anos e fazer cerveja pode ser descrito como o processo biotecnológico mais antigo que se conhece. É 7000 anos antes de Cristo que surge o mais antigo conhecimento sobre uma bebida fermentada feita à base de cereais - o “antepassado” da actual cerveja. Com o decorrer dos anos o aperfeiçoamento da produção da cerveja foi aumentando consoante a evolução da química e bioquímica assim como a evolução da tecnologia [22, 23].

Dentro da vasta gama de cervejas disponíveis, a qualidade da cerveja é o principal factor que influencia a competitividade entre elas. Uma cerveja deve oferecer qualidade genuína: o pacote e seu líquido, que se caracteriza pela sua espuma, cor, claridade, aroma e sabor [24].

2.1. Produção da Cerveja

A cerveja tem origem a partir do grão de cevada maduro e através da sua hidratação, aquecimento e secagem, obtém o malte. A cevada é o cereal tradicional para se obter o malte mas não é a única fonte. Comparando alguns produtores de cerveja, o malte adquirido é diferenciado pelos vários cereais que se podem utilizar [22, 25].

O processo de produção de cerveja (Figura 4) inicia-se na transformação do malte em farinha, Brassagem. A esta farinha é juntado água quente (cerca de 50 °C) geralmente por uma hora até se obter um xarope líquido e doce [22, 23, 26].

Por vezes, outros cereais (adjuntos) podem ser acrescentados à farinha, com a finalidade de proporcionar qualidades específicas à cerveja. Por exemplo, o trigo pode ser utilizado para reforçar a espuma da cerveja, enquanto o milho e o arroz são utilizados para melhorar o sabor e estabilidade [22]. Os níveis de ferro nas plantas podem apresentar uma variação considerável, pois esta variação depende não só da espécie de planta utilizada como do tipo de solo em que se encontra a espécie vegetal [27]. O ferro existe abundantemente na crosta terrestre em comparação com a maioria dos macronutrientes (cálcio, magnésio, potássio, fósforo, enxofre e azoto). Geralmente, para os legumes o ferro varia entre os 100 a 700 ppm e para os grãos de cereais o ferro varia entre 30 a 60 ppm

[28]. Na Tabela 3, podem-se observar os valores de ferro para os diferentes cereais utilizados na produção da cerveja.

Tabela 3: Quantidade de ferro nos diferentes tipos de cereais: cevada, trigo, milho e arroz (adaptado de [29]).

Cereal	Fe (mg/g)
Cevada	3,70
Trigo	3,30
Milho	0,00
Arroz	2,60

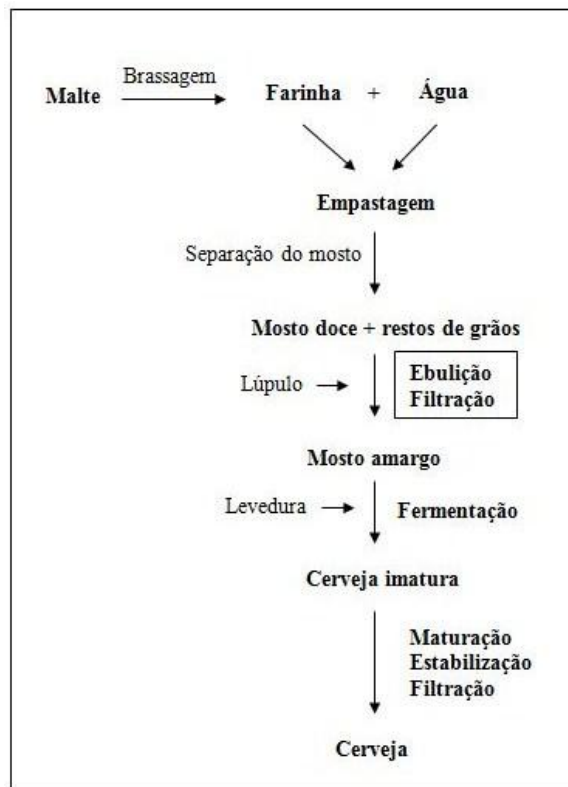


Figura 4: Esquema simplificado de um diagrama de produção de cerveja (adaptado de [30]).

O xarope obtido segue depois para o filtro ou cuba-filtro que separa os resíduos do malte. Estes resíduos servem de alimento para gado. É obtido um mosto rico em açúcares fermentáveis, proteínas solúveis, polipeptídeos e aminoácidos. Nesta etapa adiciona-se o

lúpulo (*Humulus lupulus*) (Figura 5), uma planta aromática, que confere à cerveja o amargor e o aroma característico. Segue-se uma fervura por duas horas, onde se dão reacções de escurecimento. Depois do aquecimento, as proteínas coaguladas e os resíduos de lúpulo, são removidos através de uma filtração, tornando o mosto mais claro, mosto amargo. Ao mosto amargo, junta-se a levedura e começa a dar-se a fermentação, onde os açúcares são convertidos em álcoois. Por fim, com o repouso (maturação) e estabilização desta mistura obtém-se a cerveja [22, 23].



Figura 5: Imagens da flor de lúpulo [31].

A solubilidade do ferro aumenta gradualmente durante o processo de produção de cerveja e está altamente correlacionada com os grupos reactivos fenólicos. No entanto, existe também perdas de minerais durante a produção de cerveja, especialmente durante a etapa de brassagem [32].

2.2. Espuma da Cerveja

A espuma é um sistema coloidal constituído por uma fase gasosa descontínua e uma fase líquida ou sólida contínua. A estabilização da espuma depende da presença de polipeptídeos e ácidos, fornecidos pelo lúpulo. Outros compostos contribuem para as características e propriedades da espuma [22].

Existem muitas proteínas na espuma. A proteína Z presente na cevada é a que se apresenta em maiores quantidades na cerveja, embora também existem proteínas provenientes das leveduras [22].

Os ácidos iso- α , derivados do lúpulo, estão concentrados na espuma e são responsáveis pelo amargor da cerveja [22].

Alguns cátions metálicos são responsáveis pela formação da espuma. No passado, os sais de ferro eram utilizados para melhorar a espuma das cervejas, contudo descobriu-se posteriormente que eram também responsáveis pela degradação do sabor e aroma da cerveja. Na Figura 6 está representada uma forma dos ácidos iso- α se ligarem com um cátion metálico [22].

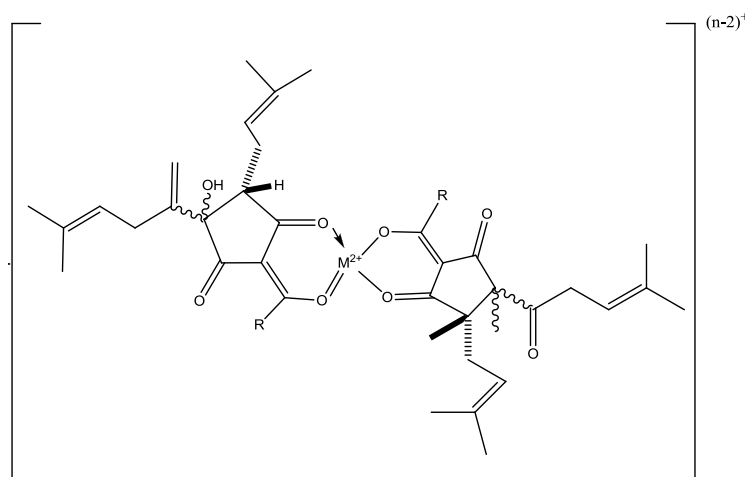


Figura 6: Estrutura do ácido iso- α com um cátion metálico [22].

A auto-oxidação e a decomposição dos ácidos iso- α desempenham um papel fundamental na deterioração do sabor e qualidade da cerveja durante o seu envelhecimento [33]. Estudos mostraram que quando se adiciona ferro (III) à cerveja, este metal forma complexos com espécies carregadas negativamente, o que mostra que a cerveja possui ligandos livres que foram formados a partir de complexos de carga negativa com os metais [18, 34].

Na presença de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol.dm}^{-3}$ de ácidos iso- α , a estabilidade da espuma da cerveja é melhorada pela presença de qualquer cátion (Fe, Co, Ni e Cu) [35].

A presença de etanol aumenta a viscosidade da água e deste modo reduz a drenagem do líquido da espuma; os lípidos e álcoois de elevado peso molecular são estruturas anfipáticas que absorvem na interface água-gás e a sua adição à cerveja é prejudicial à espuma [22].

2.3. Coloração da Cerveja

A cor da cerveja é um requisito muito importante no mercado da cerveja, pois permite o consumidor fazer a sua distinção, assim como é um factor fundamental para o controlo da sua produção [22].

Toda a coloração que a cerveja adquire, tem origem no malte e no mosto e existem quatro agentes importantes associados a cor da cerveja: os melanóides, os polifenóis oxidados, os metais vestigiais (ferro e cobre) e a riboflavina (Tabela 4) [22].

Tabela 4: Principais contribuintes químicos da cor da cerveja [22].

Componente	Fonte		Cor
	Matéria-prima	Processo	
Melanóides	Malte e maltes especiais	Ebulição / aquecimento do mosto	Amarelo, âmbar
Polifenóis oxidados	Malte, Lúpulo	Oxigenação, pasteurização	Vermelho, castanho
Ferro, Cobre	Água, Malte	-	-
Riboflavina	Malte, levedura	-	Amarelo

Os melanóides são pigmentos solúveis, com um intervalo de cores do âmbar ao amarelo e são formados nas reacções de Maillard. A formação de melanóides é favorecida por processos com temperaturas elevadas [22].

Os polifenóis oxidados têm cor vermelho-acastanhado, com origem nos polifenóis do malte. A moagem do malte e a excessiva agitação também podem levar à formação de polifenóis oxidados [22].

As interacções com os metais vestigiais também são um factor importante na cor da cerveja. O cobre e o ferro podem estimular a oxidação de compostos (como exemplo os polifenóis) [22].

Por último, a riboflavina (vitamina B2 presente nas células da levedura) pode contribuir para a cor da cerveja [22].

3. Ferro na Cerveja

Os metais, tanto majoritários, minoritários como vestigiais, são importantes na fermentação da cerveja para que forneçam o ambiente adequado para o crescimento da levedura e seu metabolismo. Uma preocupação real são as quantidades de Cobre (Cu) e Ferro (Fe), metais que estão envolvidos no envelhecimento da cerveja, devido às reacções que formam espécies reactivas de oxigénio – ROS (“reactive oxygen species”). Estas espécies reactivas podem oxidar facilmente os compostos orgânicos presentes na cerveja, mudando a qualidade e estabilidade da espuma e sabor da cerveja [17].

3.1. Fontes de Metais na Cerveja

Todos os componentes utilizados na produção de cerveja, como a água, os cereais, a cevada e a levedura, são fontes de metais que vão posteriormente fazer parte da cerveja. Por esta razão, a composição mineral da cerveja, reflecte a composição dos ingredientes usados na sua produção. A quantidade de metais numa cerveja é variável e depende da qualidade dos substratos utilizados, o tipo de cerveja que se fabrica, assim como o país que fabrica a cerveja [17].

A qualidade da água utilizada na produção de cerveja é um factor importante, isto porque se a água estiver contaminada, está-se a produzir uma cerveja contaminada. Na Tabela 5, estão listados os valores máximos de concentração permitidos para vários componentes na água utilizada na produção de cerveja. Utilizando uma água que obedeça aos parâmetros encontrados na Tabela 5, obtém-se uma cerveja sem problemas para a saúde. Relativamente ao metal em estudo neste trabalho, o ferro, observa-se que a quantidade introduzida por esta fonte é muito pequena (até 200 ppb de ferro na água) [22].

Tabela 5: Requerimentos essenciais da qualidade da água utilizada na produção de cerveja (adaptado [22]).

Parâmetros	Unidades	Concentração Máxima
Químicos Tóxicos		
Arsénio	$\mu\text{g L}^{-1}$	50
Cádmio	$\mu\text{g L}^{-1}$	5
Cianeto	$\mu\text{g L}^{-1}$	50
Crómio	$\mu\text{g L}^{-1}$	50
Mercurio	$\mu\text{g L}^{-1}$	1
Níquel	$\mu\text{g L}^{-1}$	50
Selénio	$\mu\text{g L}^{-1}$	10
Parâmetros de Qualidade		
Sulfato	$\text{mg SO}_4 \text{ L}^{-1}$	250
Magnésio	mg Mg L^{-1}	50
Sódio	mg Na L^{-1}	150
Potássio	mg K L^{-1}	12
Nitrato	$\text{mg NO}_3 \text{ L}^{-1}$	50
Nitrito	$\text{mg NO}_2 \text{ L}^{-1}$	0,1
Amónio	$\text{mg NH}_4 \text{ L}^{-1}$	0,5
Hidrocarbonetos	$\mu\text{g L}^{-1}$	10
Fenóis	$\mu\text{g C}_6\text{H}_5\text{OH L}^{-1}$	0,5
Surfactantes	$\mu\text{g L}^{-1}$	200
Alumínio	$\mu\text{g Al L}^{-1}$	200
Ferro	$\mu\text{g Fe L}^{-1}$	200
Magnésio	$\mu\text{g Mn L}^{-1}$	50
Cobre	$\mu\text{g Cu L}^{-1}$	3000
Zinco	$\mu\text{g Zn L}^{-1}$	5000
Fósforo	$\mu\text{g P L}^{-1}$	2200
Parâmetro Microbiológicos		
Coliformes Totais	número/100 mL	0
Coliformes Fecais	número/100 mL	0
Estreptococos Fecais	número/100 mL	0
Clostridia	número/20 mL	≤ 1

Outras fontes de ferro possíveis são substâncias que possam ser adicionadas durante o processo de fermentação e maturação. Também se pode referir que o equipamento utilizado, assim como o tipo de material utilizado no enchimento da cerveja (garrafa, lata ou barril) podem ser fontes de metais para a cerveja. Os recipientes da cerveja, com o armazenamento, podem levar a uma interacção entre o líquido (cerveja) e o material do recipiente e pode haver um aumento das concentrações de alumínio, cobalto, cromo, cobre, ferro e níquel, que facilmente migram para a cerveja [17].

Além das fontes directas de metais, que estão relacionadas com a própria produção da cerveja e seus constituintes, existe a contaminação dos solos, que pode ter origem nos

fertilizantes, pesticidas e processos industriais e que entram depois como fontes de metais na cerveja [36, 37].

Em suma, as principais fontes de ferro da cerveja são a água (200 ppb = 0,2 ppm) [22], os cereais ($\approx 0,003$ ppm) [29] e o solo [36, 37] onde os cereais foram cultivados, assim como o material envolvido no processo de fabrico de cerveja [17]. Na embalagem pode ocorrer migração do ferro constituinte da folha-de-flandres para a própria cerveja, como já foi referido no capítulo 1 [4, 8].

Todos estes factores influenciam para uma elevada concentração de ferro na cerveja e é recomendado um limite máximo de ferro na cerveja de 0,1 ppm [17].

3.2. Efeito dos Metais na Cerveja

A cerveja tornou-se uma bebida internacional e tem associados alguns benefícios para a saúde, quando consumida com moderação. Hoje em dia, os efeitos na saúde dos elementos vestigiais e sua concentração máxima permitida são controlados na produção de cerveja [37].

Os vestígios de alguns metais como manganês, ferro, cobre, zinco, selénio e cobalto são micro-nutrientes essenciais e têm uma variedade de funções bioquímicas em todos os organismos vivos. Estes elementos são essenciais, mas podem também ser tóxicos quando estão em excesso. Alguns elementos como o chumbo, cádmio e arsénio não são metais essenciais e podem ser considerados elementos tóxicos, até mesmo quando presentes em quantidades vestigiais. Os metais pesados são facilmente transportados através das plantas para o meio ambiente e surgem na nossa cadeia alimentar [38].

As mudanças de cor nas bebidas alcoólicas podem ser atribuídas a diferentes factores [39]:

- (a) À formação de complexos de Fe, Cu, Al ou Mg com antocianinas e taninos;
- (b) À presença de complexos metal-polifenóis;

(c) À contribuição exógena dos cátions metálicos que podem resultar em modificações de cor.

A maior parte dos metais (como o ferro, cobre, níquel, zinco) encontram-se concentrados na espuma e locais de turvação. As formas metálicas afectam significativamente a estabilidade da cerveja. O comportamento do metal na cerveja não está completamente estudado, mas sugere-se que os iões metálicos estão na forma livre ou no estado complexado com os componentes da cerveja. É difícil fazer o seu estudo porque eles estão presentes em níveis vestigiais na cerveja [40]. A perda da capacidade anti-oxidante dos compostos orgânicos da cerveja quando formam complexos com os metais está relacionada com a perda de estabilidade e sabor característico da cerveja [19].

Os iões Fe^{2+} são dominantes na cerveja fresca, mas são oxidados a iões Fe^{3+} durante a oxidação da cerveja e formam-se complexos fortes entre o Fe^{3+} e componentes da cerveja. Estes complexos podem levar à turvação da cerveja. As mudanças dos iões de ferro após as reacções dos radicais livres levam à deterioração da qualidade da cerveja [40].

Grande parte do sabor, escurecimento e turvação da cerveja acontece durante o armazenamento. Sabe-se que a deterioração da cerveja resulta das mudanças oxidativas nos componentes da cerveja. As reacções de Maillard e oxidações dos polifenóis são responsáveis pelo escurecimento da cerveja. A turvação é causada pelas reacções de polimerização dos polifenóis e proteínas e esta turvação aumenta consoante o nível de oxigénio presente [40].

A presença do ião cobre tem presumivelmente capacidade de delimitar os aminoácidos e proteínas, mas isso não previne completamente a participação deste nas reacções de oxidação. As melanoidinas são capazes de se ligarem fortemente ao ferro e cobre o que contribui para as suas propriedades anti-oxidantes. O efeito dos metais vestigiais na cerveja não depende só da sua concentração mas também do tipo de compostos que se formam com os metais. O ferro tem uma capacidade maior de formar compostos mais estáveis em comparação com o cobre. Os iões não-complexados de ferro têm um efeito negativo na qualidade da cerveja, enquanto a forma complexada não. Foi descoberto que quando o ferro é introduzido após a fermentação torna a cerveja turva,

porque não existem proteínas de alto peso molecular suficientes para complexarem com o ferro [18, 19].

As elevadas concentrações de ferro promovem a oxidação através dos radicais livres o que faz diminuir a qualidade e estabilidade do sabor da cerveja e proporcionam um sabor metálico e desagradável à cerveja. Concentrações superiores a 1 mg L^{-1} de iões de ferro são prejudiciais às leveduras. Deste modo, o limite máximo recomendado de concentração de ferro no mosto e/ou na cerveja é de 0,1 ppm. Por todas estas razões, a água leva um tratamento para reduzir os níveis de ferro dissolvido [17, 41].

Foi reconhecido que a presença de iões de Cu^+ e Fe^{2+} , estabilizam moléculas de oxigénio (O_2) dissolvidas na cerveja, capturam electrões e formam aniões de superóxido (O_2^-). Usualmente, os catiões metálicos resultantes (Cu^+ , Fe^{2+}) podem ser reduzidos novamente, para o estado de oxidação inferior, por moléculas pró-oxidantes, como alguns polifenóis. Através de mais uma protonação, os aniões O_2^- formam radicais de peridroxilo (OOH^\bullet), que são reconhecidos por ter uma actividade de oxidação elevada em comparação com as outras espécies reactivas de oxigénio. Outras reacções os aniões O_2^- podem ser reduzidos pelos catiões de Cu^+ ou Fe^{2+} a aniões de peróxido (O_2^{2-}), que podem ser facilmente protonados a peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Além disso, os radicais reactivos de hidroxilo (OH^\bullet) também podem ser produzidos pelo H_2O_2 ou O_2^- através dos iões metálicos induzidos da reacção de Fenton ou Haber-Weiss, como se pode observar na Figura 7 [17, 40, 42].

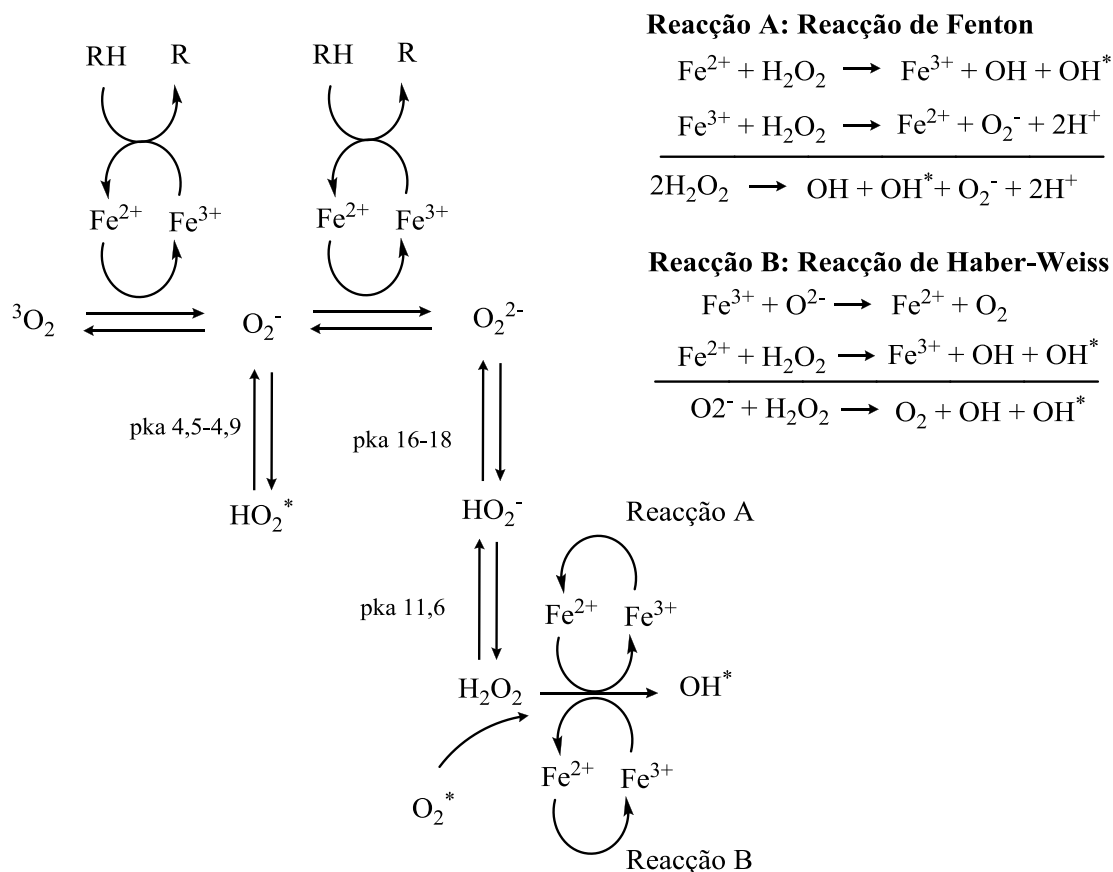


Figura 7: Reacções de produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) na cerveja (adaptado de [42]).

Durante o armazenamento da cerveja, foi provado que a adição de H_2O_2 , Fe^{3+} ou Fe^{2+} , aumenta as espécies reativas de oxigénio, portanto acelera a degradação oxidativa de componentes amargos, (exemplo as iso-humulonas). Existem aditivos capazes de inibir a degradação oxidativa como o EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético e o DETAPAC – ácido dietilenotriamino penta-acético, que são agentes quelantes de metais [40, 43].

3.2. Importância do Ferro no Organismo

Uma dieta adequada de ferro é fundamental para diminuir a incidência de anemia. A deficiência de ferro ocorre quando a procura de ferro é elevada, por exemplo, no

crescimento, numa elevada perda menstrual, na gravidez e quando a quantidade de ingestão é insuficiente ou contém elementos que tornam a sua absorção difícil [38].

O nível normal do ferro, considerado como essencial para o Homem, é mantido no corpo através de mecanismos homeostáticos e a acção toxicológica resulta de uma exposição demasiada ou elevada ingestão deste elemento [44].

A sobrecarga de ferro no povo africano é um resultado do consumo da cerveja tradicional feita em casa e também devido aos factores genéticos. A cerveja caseira é produzida pelo cozimento e fermentação do milho em panelas de ferro, de onde resulta uma cerveja com alto teor de ferro. O elevado consumo desta bebida caseira, pode levar ao cancro no esófago e afecta mais homens que mulheres. O ferro é conhecido por catalisar a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) que poderão estar ligados ao aparecimento do cancro e provocar danos oxidativos nos tecidos do esófago [45].

Para além do cancro, estudos clínicos mostram que grande parte da população que consome cerveja caseira possui uma sobrecarga de ferro no organismo que pode levar a problemas como fibrose e/ou cirrose hepática. Uma alimentação com conteúdos elevados de ferro, também está relacionada com o aparecimento do escorbuto e osteoporose, pelo desenvolvimento da diabetes e tuberculose. A prevalência na África da sobrecarga de ferro é a mais alta do mundo, com mais de 10 % da população atingida [46].

4. Fundamentos dos Métodos utilizados

4.1. Métodos Analíticos mais utilizados na Determinação do Ferro na Cerveja

A determinação do ferro na cerveja é feita usualmente por três métodos: através da colorimetria (UV-Vis), utilizando um agente complexante do ferro, através da Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama (FAAS) e através da Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite (GFAAS). Todos os três métodos têm uma boa correlação. Dos três métodos a FAAS é o método analítico mais rápido, mas o GFAAS é mais adequado para analisar pequenas quantidades de amostra [47].

4.2. Determinação do Ferro na Cerveja através da Espectroscopia de Absorção Atômica

O princípio da Espectroscopia Atômica consiste na passagem dos átomos para diferentes estados de energia quando é fornecida uma energia específica do elemento em estudo [48].

Os átomos livres a serem analisados por espectroscopia atômica são dissociados da sua matriz através da chama ou forno (existe também plasma), com aproximadamente as seguintes temperaturas [48]:

Chama – ar/acetileno a 2500 K e N₂O/acetileno a 3000 K;

Forno de Grafite – acima de 3000 K;

Plasma – de 8000 a 12000 K.

No sistema da chama, o nebulizador pulveriza a solução, na forma de uma nuvem de gotículas, num fluxo de gás que alimenta a chama. Os sistemas modernos utilizam ar/acetileno ou N₂O/acetileno como mistura de combustível para a chama. A atomização é o passo essencial para a resposta adquirida do sistema. A eficiência da chama por si só, na presença do elemento na sua forma atômica, depende de vários factores, isto é da temperatura da chama, do fluxo de gás aplicado e altura do queimador [48].

Na atomização por forno de grafite, a amostra é introduzida numa plataforma que é posicionada dentro de um pequeno forno longitudinal. O forno depois segue um programa de temperaturas controlado (Figura 8), com os seguintes passos [48]:

Passo 1: Secagem. A amostra líquida é aquecida até à temperatura de secagem (cerca de 120°C) durante 20 segundos. Esta temperatura necessita de ser suficientemente alta para causar a rápida evaporação de qualquer líquido, sem uma acção violenta de ebulição que pode ejectar gotas e deste modo perder analito.

Passo 2: Incineração. A amostra é agora aquecida até uma temperatura de incineração (possivelmente acima dos 1200 °C) para remover a maior parte possível do material da matriz. O controlo deste estado depende muito do tipo de amostra, já que o objectivo deste passo é remover a maior quantidade possível de não-analito, sem remover o próprio analito.

Passo 3: Atomização. Neste estado, a temperatura atinge o valor máximo do ciclo (até cerca de 2800 °C), levando à produção de uma nuvem de átomos vaporizados que dura apenas uns segundos.

Passo 4: Limpeza. A temperatura é mantida elevada por mais uns segundos de forma que se remova todo o material da amostra do tubo antes da próxima leitura.

A absorção devido ao analito atingirá um pico durante um período curto, o tempo de integração definido. Como a temperatura da amostra é levada até uma fase de atomização, os vários componentes da amostra serão atomizados em diferentes tempos. Deste modo, é também possível diferenciar variados componentes (selectividade) através dos tempos em que as absorções são medidas [48].

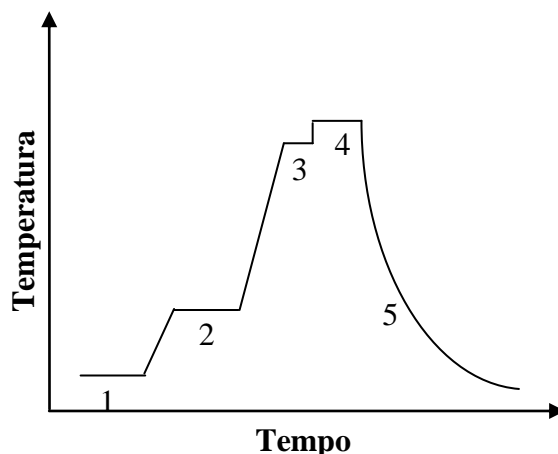


Figura 8: Representação gráfica do perfil do programa de temperaturas para o forno de grafite : (1) secagem; (2) pré-tratamento termal (incineração); (3) atomização; (4) limpeza; (5) arrefecimento (adaptado de [49]).

Na determinação de metais vestigiais na cerveja por espectroscopia atômica é necessário destruir a matéria orgânica a fim de evitar o entupimento do queimador da FAAS. Deste modo, é necessário realizar uma digestão ácida antes da determinação do ferro por espectroscopia atômica [49].

A determinação do ferro na cerveja por GFAAS pode ser feita também através de uma digestão ácida da cerveja com HNO_3 e H_2O_2 , para evitar problemas de interferentes da matriz no método analítico. A determinação do ferro na cerveja através da GFAAS pode ainda ser feita directamente da amostra de cerveja. Quando se analisa amostra de cerveja sem diluição directamente por GFAAS, a sensibilidade diminui gradualmente após injeções repetidas, isto porque fica retido no tubo de grafite uma cinza (deposito da amostra de cerveja não diluída). Nestes casos, depois de oito injeções de amostra, o sinal de absorvência é reduzido em 15 %. Para garantir a reprodutibilidade dos resultados, a cerveja deve ser diluída antes da análise por GFAAS. E quando a cerveja é diluída 10 vezes com água, não existe formação de cinza após a etapa de pirólise [18].

Quando se determina o ferro através da GFAAS pode utilizar-se um modificador químico, que permite o uso de temperaturas de incineração maiores (Figura 9) [50].

A modificação da matriz é utilizada para a estabilização do analito até ao estado de atomização, ou permitir que os componentes da matriz sejam volatilizados durante a fase

de incineração do forno de grafite. O principal objectivo do modificador químico é modificar a matriz de modo que a temperatura de separação da matriz e do analito sejam distintas [51].

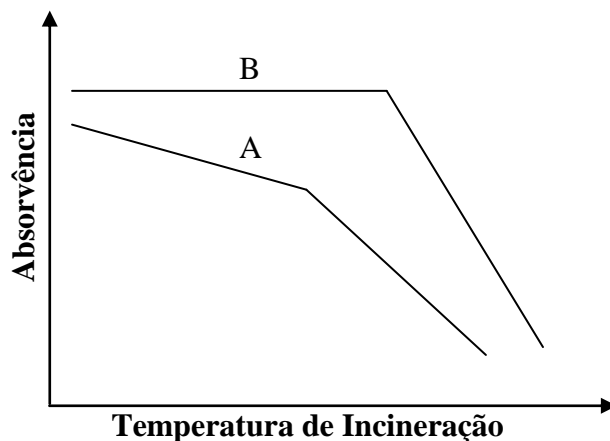


Figura 9: Representação gráfica do comportamento da Absorvência em função da temperatura de Incineração: (A) elemento; (B) elemento + modificador químico (adaptado de [51]).

4.2.1. Interferentes da Absorção Atômica

Na Espectroscopia Atômica qualquer comportamento da amostra que seja diferente das soluções padrão pode levar a uma interferência [52]. As diferentes interferências podem ser: químicas e físicas [48].

As interferências químicas podem consistir na formação de qualquer tipo de composto que evita, ou limita parcialmente, a atomização do elemento em estudo. As interferências químicas conduzem a valores por defeito. Neste tipo de interferência, as espécies presentes na matriz da amostra podem influenciar a atomização do elemento em estudo, comparativamente às soluções padrão, estas que geralmente se dissociam com facilidade [52].

No forno de grafite, a atmosfera é inerte ou redutora, de modo que, não se admite que existe interferências devido à formação de compostos com os gases da chama (óxidos, hidróxidos, etc.). No entanto, no forno de grafite pode dar-se a sublimação do elemento em estudo, já que o gás interior do forno está mais frio do que na sua superfície. Deste modo, a

amostra deve permanecer tanto quanto possível em contacto com a superfície do forno para se atomizar quantitativamente. No forno de grafite, a interferência química mais usual de ocorrer é a formação de carburetos, com a superfície do forno e com os produtos de decomposição da amostra. Os ácidos também podem ter influência na GFAAS, porque os ácidos podem formar compostos facilmente voláteis do elemento em estudo e portanto a sublimação das moléculas, podendo também haver perdas devido à deflagração dos sais a uma temperatura elevada, em especial na utilização do ácido perclórico ou nítrico [52].

Na Absorção Atômica também existem as interferências físicas da matriz, capazes de afectar o valor de absorvência medido, principalmente a pressão de vapor e a tensão superficial capazes de influenciar o tamanho das gotas obtidas; e a viscosidade influencia a velocidade com que o aerossol chega à chama. É muito importante que a viscosidade dos padrões se aproxime o mais possível da viscosidade da amostra. As interferências físicas podem ser eliminadas diluindo a amostra ou transferindo a matriz da amostra para os padrões, ou ainda através da utilização do método de adição padrão [51, 52].

As interferências físicas não se podem verificar no forno de grafite, devido às amostras serem pipetadas para o forno. No entanto, o forno de grafite não pode conter mais de 100 mg de amostra atomizada, caso contrário, a sua capacidade é excedida perdendo-se sensibilidade. A determinação com o forno pode ser fisicamente afectada pelas diferenças de viscosidade e tensão superficial entre os padrões e as amostras. As soluções mais viscosas tendem a agarrar-se à pipeta e grande parte da solução não chega ao forno. Por outro lado, soluções menos viscosas, podem ser arrastadas para a parte externa da pipeta e, novamente, uma parte significativa da solução não chega ao forno. Soluções com elevadas concentrações de ácido (20-50 %) e alguns solventes orgânicos têm este comportamento descrito [50].

4.2.2. Tratamento Prévio da Amostra de Cerveja para Determinação do Ferro por Absorção Atômica

4.2.2.1. Desgaseificação

Na cerveja existem vários procedimentos de desgaseificação, tais como a filtração, agitação, repouso por 24 horas antes de se adicionar ácido nítrico, através da passagem de árgon pela amostra de cerveja, através da colocação da cerveja num banho de ultrasons, entre outros [18, 37, 44].

O passo de desgaseificação é muito importante para assegurar uma secagem de amostra estável no forno de grafite [18].

É importante evitar a manipulação da amostra, de modo que se exclui a filtração como procedimento de desgaseificação. A agitação ou a colocação da amostra num banho de ultrasons mostrou não ser eficiente na remoção total do gás da cerveja. Ao deixar em repouso a amostra de cerveja 24 horas a cerveja tornava-se turva, o que podia interferir na leitura da absorvência no UV-Vis pelo método de adição padrão. Com esta informação, adaptou-se um novo método de desgaseificação da cerveja que consistiu em colocar a amostra de cerveja em agitação e em vácuo durante meia hora.

4.2.2.2. Digestão da Amostra de Cerveja

As bebidas alcoólicas têm matrizes aquosas muito complexas contendo uma grande variedade de compostos orgânicos e as técnicas instrumentais devem lidar com a sua presença, geralmente através de um pré-tratamento da amostra [39].

A instrumentação de análise tem tido avanços significativos. Contudo, as técnicas de digestão de amostras não tiveram o mesmo grau de desenvolvimento, apesar de

geralmente serem o factor que mais contribui para o desvio padrão total do processo analítico [48].

Existem vários tipos de digestão ácida tais como a utilização de HNO_3 e H_2O_2 ou H_2SO_4 e H_2O_2 , geralmente através de um aquecimento, que pode ser feito numa placa ou por microondas, sendo o último caso o mais utilizado, devido ao menor tempo exigido. A matéria orgânica pode ser responsável pela complexação com alguns metais (Fe e Cu), vários estudos mostraram que o processo de digestão pode não ser eficiente a eliminar os complexos de ferro. Comparando os dois ácidos utilizados na digestão da cerveja, o HNO_3 parece ser menos eficaz na destruição da matéria orgânica associada ao ferro [48, 53].

4.3. Determinação do Ferro na Cerveja através Espectroscopia de Absorção Molecular UV-VIS (Método Colorimétrico da o-fenantrolina)

Os instrumentos que medem a absorção selectiva da radiação das soluções são conhecidos como colorimétricos e espectrofotométricos [54].

Na actualidade existem muitos métodos espectrofotométricos de análise utilizando a transmitância (ou absorção) de determinados comprimento de onda, que são característicos consoante a cor/ concentração da solução [55].

Um reagente colorimétrico amplamente utilizado na determinação de ferro é o cromogénico de ferroína. Bons exemplos deste tipo de reagente, preparado e caracterizado por Blau no final de 1800, são 1,10-fenantrolina e 2,2'-bipiridina [56].

A estrutura planar da 1,10-fenantrolina está representada na Figura 10 [57].

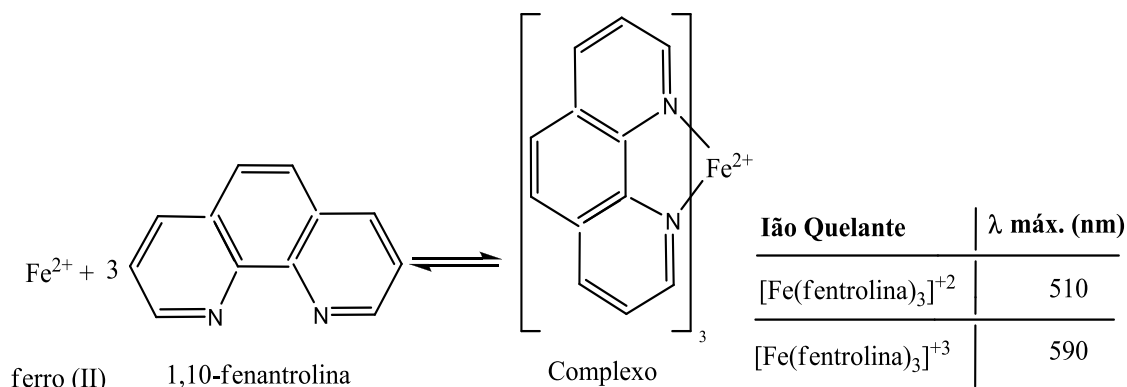


Figura 10: Esquema do complexo de 3 ligantes de fenantrolina e o ferro (II) assim como as absorvências do complexo (com Fe (II) e Fe (III)) (adaptado de [57]).

Estudos realizados provam que a fórmula $[\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3]^{+3}$ é menos estável em comparação com a fórmula $[\text{Fe}(\text{fenantrolina})_3]^{+2}$ [58].

A determinação do ferro da cerveja pode ser feita através do método colorimétrico da o-fenantrolina. Através do método de adição padrão, evitam-se interferentes devido à matriz da cerveja, sendo assim, utilizando soluções com cerveja desgasificada e padrões de ferro, com ácido ascórbico (agente redutor) e com o-fenantrolina passados 30 minutos de reacção lê-se a absorvência e pode-se determinar a concentração de ferro para esta amostra de cerveja [16].

Consoante as quantidades de ferro encontradas na cerveja, desenvolvem-se cores a variar entre o laranja claro até um laranja-avermelhado bem forte. O tom de laranja é devido à mistura da cor amarela da cerveja e dos complexos de ferro que se formam [59].

Para alguns tipos de cerveja, com uma cor mais forte (exemplo a cerveja preta), a espectrofotometria convencional baseada na complexação com a 1,10-fenantrolina ou a 2,2'-bipiridina é um método inconveniente, devido aos limites de detecção e à incapacidade de desenvolver cores distintas entre as diferentes soluções [60].

4.3.1. Interferentes

Existem três tipos de interferentes principais na determinação do ferro com a 1,10-fenantrolina [57]:

- Formação da cor através de outros iões com a fenantrolina;
- Consumo de fenantrolina por outros iões;
- Complexação do ião ferro com outras espécies.

Os dois primeiros tipos podem ser frequentemente evitados utilizando um reagente que vá reagir com os interferentes. O terceiro tipo requer normalmente, a remoção ou destruição da espécie em competição com a fenantrolina. Grande parte das substâncias interferentes podem ser toleradas consoante o pH, quantidade de fenantrolina aplicada, etc. [57].

A instabilidade que o complexo tem, pode ser diminuída com a adição de ácido fosfórico, fluoreto de amónio, tartarato de amónio e EDTA [61].

Em qualquer determinação colorimétrica podem surgir efeitos indesejáveis devido à presença de soluções coloidais, ou sólidos em suspensão (como o pó), que dispersam a luz e diminuem a intensidade da radiação transmitida. A formação de bolhas de gás nas paredes da célula pode provocar o mesmo efeito. A adsorção de uma substância pelas paredes das células pode provocar erros na medida e a evaporação de um solvente provoca elevados valores de concentração do soluto e portanto conduz a um valor errado. A variação de temperatura pode mudar a distribuição de energia dos modos vibracionais correspondentes aos estados electrónicos e assim afectar a posição e a intensidade da transição electrónica envolvida [52].

Uma vez seleccionadas as melhores condições para traçar o espectro de absorção, este deve traçado a fim de localizar o comprimento de onda de absorção máxima. As medições de absorvência para fins analíticos são quase sempre feitas onde o comprimento de onda de absorção é máximo. Existem várias razões para tal; Tanto a sensibilidade como a reprodutibilidade ou precisão, na análise de vestígios são relativamente pobres se a absorvência for medida a um comprimento de onda em que a espécie é muito mais

transparente do que o máximo de absorção. Outra razão, pode ser devido a um pequeno erro no acertar do botão dos comprimentos de onda do aparelho, ou um pequeno deslocamento nas ligações mecânicas do prisma (ou rede), que pode provocar um desvio maior quando a absorvência é sensivelmente dependente do comprimento de onda, como acontece na parte lateral de uma banda de absorção, do que quando a absorvência é quase independente dele [52].

5. Materiais e Métodos

5.1. Material

Todo o material volumétrico era de classe A. O material antes de ser utilizado foi previamente lavado de acordo com a Tabela 6. Este processo de lavagem é fundamental, evitando-se possíveis contaminações de metais das amostras em análises onde se pretende determinar quantidades muito pequenas de ferro. Para além da limpeza do material, é importante manter o ambiente de trabalho sempre limpo e ter especial atenção em não manipular a amostra com espátulas metálicas nem deixar secar o material de vidro em suportes de ferro, tendo-se dado preferência à madeira.

Tabela 6: Passos e procedimentos para a lavagem do material.

Passos	Procedimentos
1º	Lavar o material muito bem com detergente.
2º	Enxaguar muito bem com água da torneira, de modo a sair todo o detergente.
3º	Passar o material por água destilada abundantemente.
4º	Mergulhar o material numa solução de HNO_3 a 4%, durante 60 minutos.
5º	Passar o material por água destilada, de modo a não ficar presente nenhum ácido.
6º	Por fim, passar o material com água Milli-Q.

5.2. Reagentes

Os reagentes foram usados sem qualquer tratamento prévio. Utilizou-se:

Orto-fenantrolina ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2$) Merck PN 123 946, solução padrão de Ferro ($1,000 \pm 0,002$ g/L) Panreak 313182, ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) Panreak 131013.1208, peróxido de hidrogénio 30 % (H_2O_2) Riedel-de-Haën 31642, ácido sulfúrico 95-97 % (H_2SO_4) Riedel-de-Haën 30743.

5.3. Amostras de Cerveja

As latas de cerveja estudadas foram produzidas a partir de folhas-de-flandres. São latas com fabricação de duas peças, com profundidade e diâmetro pequeno na parede do corpo. A cerveja de lata do lote L3309092 contém 5,4 % de álcool, 33 cL e foram embaladas no dia 30 de Março de 2009; a cerveja de lata do lote L3317771 contém 5,6 % de álcool, 33 cL e foram embaladas em Março de 2007. As latas dos dois lotes foram armazenadas e analisadas à temperatura ambiente (entre os 20-25 °C).

Do lote L3309092 foram distintos 2 tipos de latas: latas normais e as latas amolgadas; onde as latas amolgadas sofreram uma alteração física, através de várias pancadas na superfície da lata.

5.4. Instrumentos de Laboratório

Espectrofotômetro de Absorção Molecular no UV-Vis UV-2101 PC, Milli-Q Millipore Plus 185, Espectrofotômetro de Absorção Atômica de Chama Perkin Elmer (AAnalyst 100), Espectrofotômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite Varian (SpectrAA-800, GTA-100).

5.5. Preparação de Soluções e da Amostra de Cerveja

5.5.1. Preparação da orto-fenantrolina a 0,3%

Dissolveram-se 0,075 g de o-fenantrolina em H₂O Milli-Q aquecida a 70°C, que se deixou arrefecer, antes de se transferir para um balão de 25,00 mL, tendo-se ajustado o volume à mão com água Milli-Q à temperatura ambiente, obtendo-se o reagente de cor.

5.5.2. Preparação da Amostra de Cerveja

Antes da análise do ferro contido na cerveja, a cerveja foi desgaseificada. Para isso coloca-se a cerveja em agitação e em vácuo, num balão de 2 L, durante 30 minutos, como se pode observar na Figura 11.



Figura 11: Fotografia do método de desgaseificar a cerveja em vácuo neste trabalho.

5.5.3. Preparação das Soluções a usar no Método da Adição Padrão

O método de adição padrão é especialmente útil para analisar amostras complexas onde a probabilidade de se obterem efeitos devido à sua matriz é grande [62].

Utilizando uma solução padrão de Ferro de 1000 ppm, água Milli-Q e a cerveja desgaseificada, preparam-se os balões de cerveja com padrão de ferro, como é indicado na Figura 12.

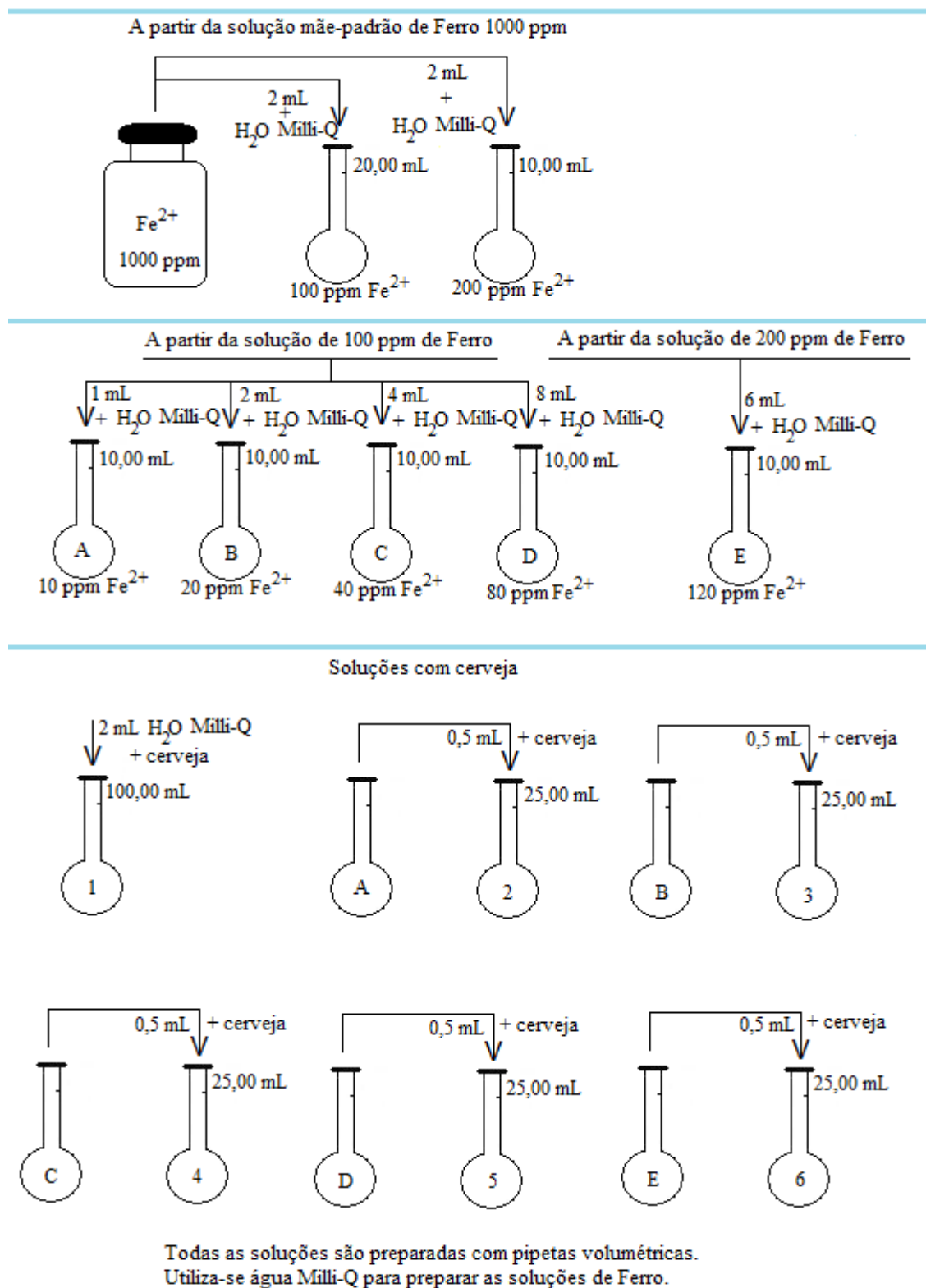


Figura 12: Esquema ilustrativo da preparação dos balões de cerveja com padrão de ferro.

Na Tabela 7, encontram-se os valores da concentração do ferro adicionado aos balões com cerveja.

Tabela 7: Tabela de concentrações finais de ferro nos balões de cerveja com padrão de ferro.

Balão de Cerveja	Volume final (mL)	Concentração final do ferro nos balões de cerveja (ppm)
1	100,00	0,00
2	25,00	0,20
3	25,00	0,40
4	25,00	0,80
5	25,00	1,60
6	25,00	2,40

5.6. Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina

Na determinação do ferro na cerveja através do método colorimétrico da o-fenantrolina é necessário juntar o reagente de cor (o-fenantrolina) à solução dos balões de cerveja com padrão de ferro e esperar o desenvolvimento da cor para depois fazer a leitura da absorvência e traçar a recta de calibração. De seguida, estão descritos os passos necessários para obter a recta de calibração.

1. Prepararam-se 7 copos, devidamente identificados (Referência, 1,2,3,4,5,6):
 - Para a Referência mediram-se 50,0 mg de ácido ascórbico;
 - Para os restantes copos mediram-se 25,0 mg de ácido ascórbico;
2. A partir dos balões de cerveja com padrão de ferro, retirou-se com pipetas volumétricas, as quantidades indicadas na Tabela 8, para os copos.

Tabela 8: Volume de solução a retirar dos balões de cerveja com padrão de ferro para os copos.

Balão de Cerveja	Volume retirar (mL)	Copo
1	50,00	Referência
1	25,00	1
2	25,00	2
3	25,00	3
4	25,00	4
5	25,00	5
6	25,00	6

Observação: A Referência necessita de maior quantidade de solução, pois na análise por UV-Vis é necessário utilizar tanto células de 5 cm como células de 1 cm, porque se pretende obter absorvências no intervalo [0,200-0,900], deste modo, ao se realizar a linha de base, os 25 mL não serão suficientes para encher as células de 5 cm.

3. Colocou-se o reagente de cor (ou a água Milli-Q) nos copos consoante indicado na Tabela 9.

Tabela 9: Volume de reagente de cor (ou água Milli-Q) a adicionar a cada copo.

Reagente	Volume do Reagente (mL)	Copo
Água Milli-Q	4,0	Referência
Reag. de cor	2,0	1
Reag. de cor	2,0	2
Reag. de cor	2,0	3
Reag. de cor	2,0	4
Reag. de cor	2,0	5
Reag. de cor	2,0	6

4. Após colocar o reagente de cor, cronometraram-se 30 minutos. Leu-se de seguida a absorvência ($\lambda = 511,00$ nm) das soluções dos diferentes copos (1,2,3,4,5 e 6) contra a Referência.
5. Traçou-se a recta de calibração.

5.6.1. Cálculo da Concentração de Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina

A solução final de cerveja analisada no UV-Vis não tem a mesma concentração de ferro que nos balões de cerveja com padrão de ferro, porque quando se adiciona o reagente de cor, faz-se uma diluição da solução e é necessário calcular a concentração de ferro obtida nestas novas soluções. Deste modo, na Tabela 10, estão as novas concentrações de ferro, tendo em conta que o volume inicial nos copos é de 25,00 mL e o final é (com a adição de 2,00 mL de reagente de cor) 27,00 mL, calcula-se simplesmente as concentrações finais obtidas pela expressão:

$$c_{vi} = c_{vf}$$

Exemplo aplicado para o copo 3 no procedimento experimental da determinação de ferro na cerveja pelo método colorimétrico da o-fenantrolina:

$$c_f = \frac{c_{vi}}{v_f}$$
$$c_f = \frac{0,40 \times 25}{27} = 0,37 \text{ ppm}$$

Tabela 10: Valores de concentração final de ferro nos copos de análise de cerveja.

Copo	[Fe ²⁺] ppm
Referência	0,00
1	0,00
2	0,19
3	0,37
4	0,74
5	1,48
6	2,22

O cálculo da concentração de ferro é feito através da extrapolação da recta, devido a se ter utilizado o método de adição padrão; onde o valor da concentração, x_E , é o modulo de x quando y = 0.

Através dos valores de x (concentrações de ferro) e dos valores de y (valores de absorvência) é possível determinar o intervalo de confiança associado ao valor de concentração de ferro determinado, utilizando as seguintes expressões [63]:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad e \quad s_{xE} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Onde s_{xE} é o desvio padrão da concentração de ferro, o $s_{y/x}$ é o desvio padrão associado à direcção-y, b é o declive, n é o número de pontos da recta.

Deste modo, para se exprimir a concentração de ferro com um intervalo de confiança de 95%, com n=6 (t=2,78), utiliza-se a seguinte equação [63]:

$$x_E = x_E \pm (2,78 \times s_{xE})$$

5.7. Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método FAAS

5.7.1. Digestão Ácida da Cerveja

Toda a digestão ácida assim como a manipulação dos reagentes utilizados na digestão da cerveja foi feita na hotte.

Num copo de 250 mL, juntou-se 50,00 mL de cerveja desgaseificada e adicionou-se 20,00 mL de H₂O₂ 30% [53].

À mistura anterior adicionaram-se cuidadosamente 5,00 mL de H₂SO₄ e aqueceu-se lentamente até que a reacção se iniciou. De seguida aqueceu-se até se formarem vapores de H₂SO₄ [53].

A digestão ficou completa quando os vapores do ácido sulfúrico se tornaram incolores [53].

Se em qualquer momento da digestão se notou que o conteúdo do copo estava a secar, arrefeceu-se a solução e adicionou-se 2 a 3 mL de H_2SO_4 para continuar a digestão [53].

Depois de arrefecer, o conteúdo foi diluído em balões de 20,00 mL com água Milli-Q [53].

Para os brancos, repetiram-se os passos anteriores mas em vez de cerveja desgaseificada utilizou-se 50,00 mL de água Milli-Q [53].

Para cada amostra e branco, foi feita uma réplica.

5.7.2. Recta de Calibração do Método FAAS e Determinação do Ferro na Amostra de Cerveja

Utilizando uma solução padrão de Ferro de 1000 ppm e água Milli-Q acidificada com H_2SO_4 a 2%, preparou-se a solução-mãe de ferro (1ppm), como é indicado na Tabela 11.

Tabela 11: Preparação da Solução-mãe de ferro (1 ppm) a partir de uma solução padrão de 1000 ppm.

Padrão Fe Inicial (ppm)	Volume Retirar (mL)	Volume Final (mL)	Conc. Final Fe (ppm)
1000	2,00	20,00	100
100	2,00	20,00	10,0
10,0	5,00	50,00	1,00

De seguida, prepararam-se os padrões de ferro a partir da solução-mãe de ferro de 1,00 ppm, como é indicado na Tabela 12.

Tabela 12: Preparação dos padrões de ferro a utilizar na recta de calibração do método FAAS a partir da solução-mãe de 1,00 ppm, para balões volumétricos de 20,00 mL.

Padrão	[Fe] (ppm)	Volume Retirar [Fe] = 1,00 ppm (mL)
1	0,00	0,00
2	0,05	1,00
3	0,10	2,00
4	0,15	3,00
5	0,20	4,00
6	0,40	8,00
7	0,60	12,00
8	0,80	16,00

Para cada padrão de ferro, amostra de cerveja digerida e branco digerido, leu-se a absorvência 5 vezes, através da FAAS.

Traçou-se a recta de calibração com a média dos valores de absorvência vs os valores de concentração dos padrões de ferro e determinou-se a concentração de ferro.

A concentração de ferro é calculada pela diferença entre a média das concentrações de cerveja digerida e a média das concentrações dos brancos digeridos. O valor obtido tem de ser multiplicado por 2,5, já que no início da digestão se utilizaram 50,00 mL de cerveja e no final a amostra acaba num balão volumétrico de 20,00 mL ($50/20 = 2,5$), ou seja, foi lido um valor pré-concentrado 2,5 vezes.

5.8. Procedimento Experimental usado na Determinação de Ferro na Cerveja pelo Método GFAAS

5.8.1. Análise do Ferro da Cerveja Digerida pelo Método GFAAS

O programa de temperaturas estabelecido no método GFAAS quando se realiza uma digestão ácida da cerveja (referida no Procedimento experimental da FAAS) está descrito na Tabela 13. Este programa de temperaturas está de acordo a referência [50].

Tabela 13: Programa de temperaturas na câmara de grafite, para amostras de cerveja digeridas.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de Rampa (s)	Tempo de Espera (s)	Fluxo de Gás (L/min)
Secagem(1)	85	5	0	3,0
Secagem(2)	95	40	0	3,0
Secagem(3)	120	10	0	3,0
Pirólise(1)	700	5	1	3,0
Pirólise(2)	700	2	0	0,0
Atomização	2300	1,1	2	0,0
Limpeza	2300	2	0	3,0

A partir de uma solução padrão de Ferro de 1000 ppm e água Milli-Q, preparou-se a solução-mãe de ferro de 50 ppb.

Programou-se então o instrumento de absorção atômica para preparar soluções padrão de ferro por diluição da solução-mãe de 50 ppb. Na Tabela 14 listam-se as concentrações dos padrões.

Tabela 14: Concentrações de ferro a escolher no programa: método e sequência, a partir de uma solução-mãe de 50 ppb.

Padrão	[Fe] (ppb)
1	0,0
2	5,0
3	10
4	15
5	25
6	35
7	40
8	50

Programou-se ainda o instrumento de modo a fazer-se uma diluição de 4 vezes da amostra e branco digerido, para os valores de concentração de ferro estarem dentro do intervalo da recta de calibração. Todas as leituras da absorvência foram repetidas 5 vezes.

Traçou-se a recta de calibração a partir da média das absorvências em função da concentração dos padrões de ferro e determinou-se a concentração de ferro na amostra da cerveja digerida e diluída, através da diferença entre a média das concentrações de ferro obtidas para a amostra de cerveja e a média das concentrações de ferro no branco.

Este valor de concentração de ferro teve que ser multiplicado por 2,5, devido à pré-concentração feita aquando da digestão ácida e posteriormente multiplicado por 4, devido à diluição feita nas amostras e brancos.

5.8.2. Análise do Ferro da Cerveja Diluída pelo método GFAAS

O programa de temperaturas estabelecido no método GFAAS quando se realizou a análise directa da cerveja, apenas com uma simples diluição de 10 vezes, está descrito na Tabela 15. Este programa de temperaturas é uma adaptação da referência [18].

Tabela 15: Programa de temperaturas na câmara de grafite, para análise directa de amostras de cerveja.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo de Rampa (s)	Tempo de Espera (s)	Fluxo de Gás (L/min)
Secagem(1)	85	5	0	3,0
Secagem(2)	95	40	0	3,0
Secagem(3)	120	25	15	3,0
Pirólise(1)	700	5	1	3,0
Pirólise(2)	900	5	20	3,0
Pirólise(3)	900	2	0	0,0
Atomização	2300	1,1	2	0,0
Limpeza	2300	2	0	3,0

A partir de uma solução padrão de Ferro de 1000 ppm e água Milli-Q, preparou-se a solução-mãe de ferro de 100 ppb.

Programou-se então o instrumento de absorção atômica para preparar soluções padrão de ferro por diluição da solução-mãe de 100 ppb. Na Tabela 16 listam-se as concentrações dos padrões.

Tabela 16: Concentrações de ferro a escolher no programa: método e sequência, a partir de uma solução-mãe de 100 ppb.

Padrão	[Fe] (ppb)
1	13,3
2	20,0
3	40,0
4	60,0
5	80,0
6	100

Mandou-se correr o programa e leu-se a absorvência 2 vezes para as amostras e brancos e 1 vez para os padrões.

Traçou-se a recta de calibração com as absorvências em função da concentração dos padrões de ferro e determinou-se a concentração de ferro na cerveja diluída, através da diferença entre a média das concentrações de ferro na amostra de cerveja e a média das concentrações de ferro no branco.

Este valor de concentração de ferro teve de ser multiplicado por 10, devido à diluição feita nas amostras.

6. Resultados e Discussão

6.1. Análise do Ferro na Cerveja pelo Método Colorimétrico da o-fenantrolina

6.1.1. Selecção do Comprimento de Onda

Pretende-se determinar o comprimento de onda adequado para fazer a análise do ferro através da espectrofotometria UV-Vis. Deste modo, foi feito um estudo em que se traçou o espectro da absorvência para uma solução de cerveja com padrão de ferro após a formação do complexo ferro-fenantrolina, varrendo o comprimento de onda entre os 400 e os 600 nm.

Na Figura 13 pode ver-se o espectro do complexo corado.

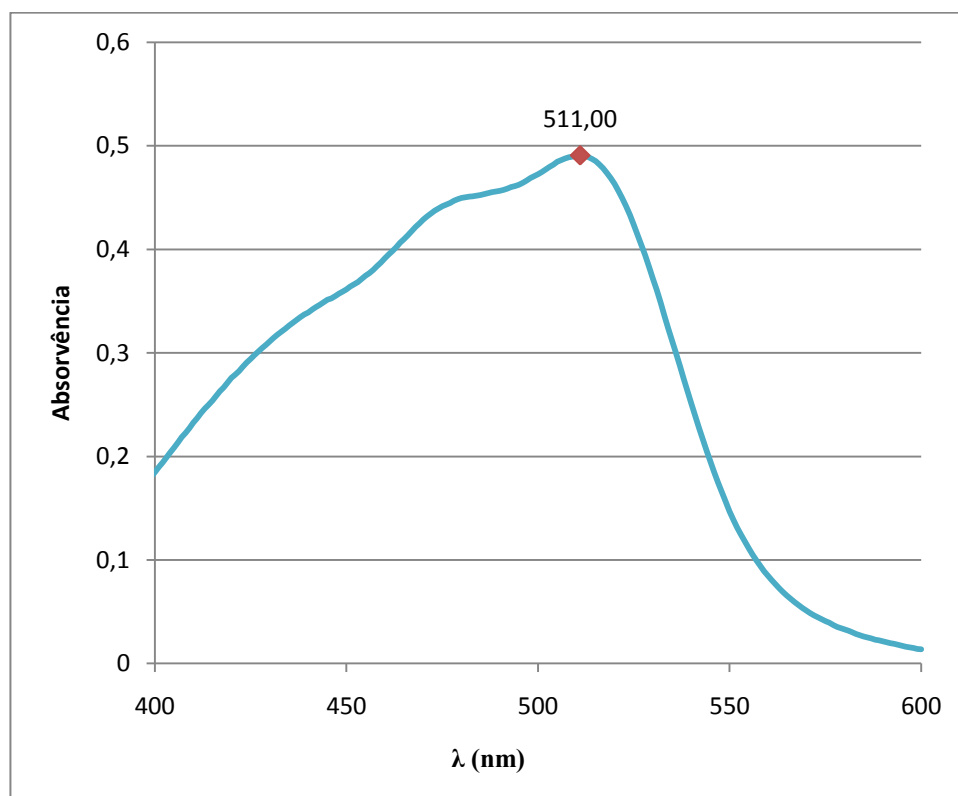


Figura 13: Espectro do complexo corado, com comprimento de onda máximo de 511,00 nm.

Da observação da Figura 13 concluiu-se que o comprimento de onda para o qual a Absorvência era máxima foi de 511,00 nm, tendo sido este o valor seleccionado de agora em diante nas análises.

6.1.2. Estudo da Estabilidade da Cor ao Longo do Tempo

No método Oficial da determinação do ferro na cerveja através da o-fenantrolina [16], refere-se que são necessários 30 minutos de reacção antes de se medir a absorvência do complexo corado.

Com a finalidade de se saber se a cor se degrada e a absorvência diminui após estes 30 minutos de reacção, realizou-se um estudo sobre a estabilidade da cor do complexo ao longo do tempo.

Na Tabela 17, está o registo das absorvências máximas da solução de cerveja com 2,22 ppm de ferro adicionado ao longo do tempo (1-35 minutos), após a adição de reagente de cor (o-fenantrolina).

Tabela 17: Registo das absorvências a 511,00 nm de uma solução de cerveja com 2,22 ppm de ferro adicionado ao longo do tempo, após a adição do reagente de cor.

Tempo (min)	Abs
1	0,489
5	0,489
10	0,490
15	0,490
20	0,490
25	0,491
30	0,491
35	0,491

Analisando a Tabela 17, conclui-se que não existe variação da absorvência da solução de cerveja entre os 25 e os 35 minutos. Esta informação é importante, porque se

houver algum descuido no controlo do tempo de reacção do reagente de cor com a amostra, já se sabe que não há grandes diferenças nos valores obtidos 5 minutos antes ou depois dos 30 minutos recomendados.

6.1.3. Análise do Ferro na Cerveja ao Longo do Tempo

No estudo da migração do ferro das latas da cerveja foi usado o método da fenantrolina. Na Tabela 18 estão representados os resultados obtidos nas análises da cerveja das latas, feitas ao longo do tempo de armazenagem. Mostram-se ainda as rectas de calibração obtidas nas análises do ferro ao longo do tempo.

Tabela 18: Tabela resumo das análises do ferro na cerveja ao longo do tempo.

Análise	Dias	Recta de Calibração	R ²	[Fe] ± IC (ppm)
Latas normais		Lote: L3309092		
21-04-2009	21	y = 0,2062x + 0,0108	0,9997	0,058 ± 0,038
03-06-2009	69	y = 0,1986x + 0,0066	0,9998	0,037 ± 0,021
08-06-2009	74	y = 0,1984x + 0,0098	0,9997	0,054 ± 0,027
17-07-2009	113	y = 0,1925x + 0,0071	0,9998	0,041 ± 0,024
13-08-2009	140	y = 0,1939x + 0,0051	0,9999	0,029 ± 0,016
16-09-2009	177	y = 0,2006x + 0,0081	0,9998	0,045 ± 0,022
20-10-2009	208	y = 0,2024x + 0,0130	0,9997	0,071 ± 0,026
25-11-2009	244	y = 0,1972x + 0,0112	0,9997	0,063 ± 0,027
21-12-2009	270	y = 0,1975x + 0,0134	1,0000	0,075 ± 0,008
19-01-2010	299	y = 0,2075x + 0,0118	0,9997	0,063 ± 0,027
18-02-2010	329	y = 0,2101x + 0,0091	0,9997	0,048 ± 0,027
22-03-2010	361	y = 0,2073x + 0,0089	0,9996	0,047 ± 0,033
19-04-2010	389	y = 0,2099x + 0,0048	0,9998	0,025 ± 0,022
24-09-2010	547	y = 0,2023x + 0,0088	0,9997	0,048 ± 0,028
28-10-2010	581	y = 0,2148x + 0,0074	0,9998	0,038 ± 0,025
Latas Amolgadas		Lote: L3309092		
01-06-2009	67	y = 0,1972x + 0,0080	0,9999	0,045 ± 0,014
17-07-2009	113	y = 0,1939x + 0,0084	0,9999	0,048 ± 0,014
13-08-2009	140	y = 0,1985x + 0,0065	0,9999	0,036 ± 0,015
16-09-2009	177	y = 0,1952x + 0,0100	0,9997	0,057 ± 0,030
20-10-2009	208	y = 0,1978x + 0,0121	0,9998	0,067 ± 0,026
25-11-2009	244	y = 0,2008x + 0,0138	0,9996	0,076 ± 0,034
21-12-2009	270	y = 0,1974x + 0,0125	0,9998	0,070 ± 0,023
19-01-2010	299	y = 0,2074x + 0,0221	1,0000	0,120 ± 0,006
23-02-2010	334	y = 0,2022x + 0,0138	0,9996	0,075 ± 0,032
22-03-2010	361	y = 0,2038x + 0,0124	0,9997	0,067 ± 0,031
19-04-2010	389	y = 0,2102x + 0,0071	0,9998	0,037 ± 0,024
24-09-2010	547	y = 0,2039x + 0,0094	0,9997	0,051 ± 0,027
27-10-2010	580	y = 0,2161x + 0,0945	0,9997	0,482 ± 0,035
27-10-2010	580	y = 0,2112x + 0,0308	0,9991	0,161 ± 0,054
28-10-2010	581	y = 0,2105x + 0,0721	0,9996	0,377 ± 0,039
Latas Antigas		Lote: L3317771		
16-06-2009	839	y = 0,2094x + 0,3253	0,9998	1,710 ± 0,049
26-10-2010	1336	y = 0,1789x + 0,1387	0,9996	0,850 ± 0,074
26-10-2010	1336	y = 0,1959x + 0,1315	0,9998	0,740 ± 0,042

IC- Intervalo de Confiança (95%)

Na Figura 14 apresenta-se em gráfico os resultados das análises do ferro, das latas do lote L3309092, ao longo do seu armazenamento, acompanhados do intervalo de confiança, para as latas normais e amolgadas. Para referência traçou-se uma linha correspondente ao limite máximo recomendado (0,1 ppm [17]) para o ferro presente na cerveja.

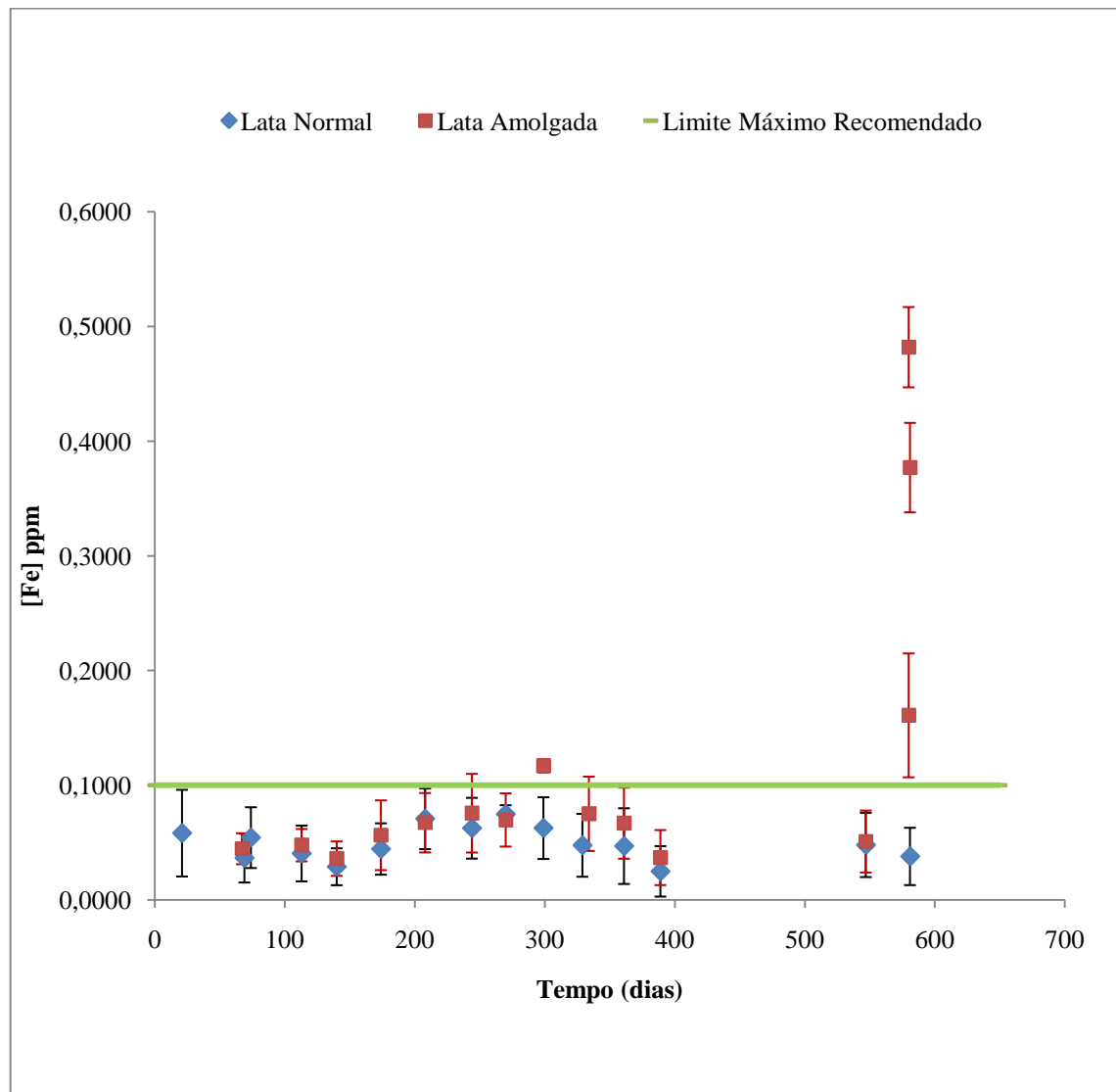


Figura 14: Representação gráfica da concentração do ferro na cerveja do lote L3309092 em função do tempo.

Como se pode observar pela Figura 14, as cervejas das latas normais do lote L3309092, têm valores de concentração de ferro abaixo do limite máximo recomendado e não se consegue notar uma variação da concentração ao longo do tempo, porque para isso precisava-se de um método mais preciso. Portanto, como os valores obtidos da concentração de ferro ao longo do tempo não são significativamente diferentes, para esta cerveja, pode-se dizer que a sua qualidade em relação ao ferro presente se manteve durante 581 dias. Em suma, as análises das latas normais do lote L3309092 não apresentam migração do ferro significativa da folha-de-flandres para a cerveja.

Ainda visualizando a Figura 14, para a maioria das latas, os valores de concentração de ferro na cerveja são muito baixos e durante a maior parte das análises não se conseguem diferenciar as latas normais das latas amolgadas, com a exceção dos dias 299, 580 e 581. O valor do ferro nas latas amolgadas ($[\text{Fe}]_{299\text{dias}} = 0,120 \pm 0,006$; $[\text{Fe}]_{580\text{dias}} = 0,482 \pm 0,035$; $[\text{Fe}]_{580*\text{dias}} = 0,161 \pm 0,054$; $[\text{Fe}]_{581\text{dias}} = 0,377 \pm 0,039$) ultrapassou o limite máximo de ferro recomendado. Há ainda dois outros valores em duas outras latas amolgadas ($[\text{Fe}] = 0,076 \pm 0,034$ e $[\text{Fe}] = 0,075 \pm 0,032$), onde o limite superior do intervalo de confiança ultrapassou o limite recomendado, podendo também nestes casos, ter existido uma migração do ferro das latas amolgadas para a cerveja.

Na maior parte das análises feitas ao ferro nas latas amolgadas os valores eram da mesma ordem de grandeza que as latas normais. Uma justificação para estes valores mais elevados pode dever-se ao tipo de agressão feita à lata, isto é, à força aplicada e consequentemente ao tipo de danos provocados na folha-de-flandres das latas.

Na Figura 15 pode observar-se o interior da lata amolgada e normal com 299 dias do lote L3309092. Como se vê no gráfico da Figura 14, a lata amolgada do dia 299, apresenta um valor de concentração de ferro na cerveja mais elevado do que as outras latas. Analisando a Figura 15, são visíveis na lata (a) umas manchas amarelo/avermelhadas nas irregularidades da folha-de-flandres, que não estão presentes na lata (b). Estas manchas podem ter sido responsáveis pela migração do ferro da folha-de-flandres para a cerveja. É importante referir que nesta figura apenas está representada uma pequena porção da folha-de-flandres e foi escolhida uma porção com mais manchas, já que quando se observou todo o interior da lata nem todas as irregularidades da folha-de-flandres possuía manchas. Esta

observação permite concluir que o tipo de agressão feita à lata é fundamental para que haja ou não migração do ferro para a cerveja.

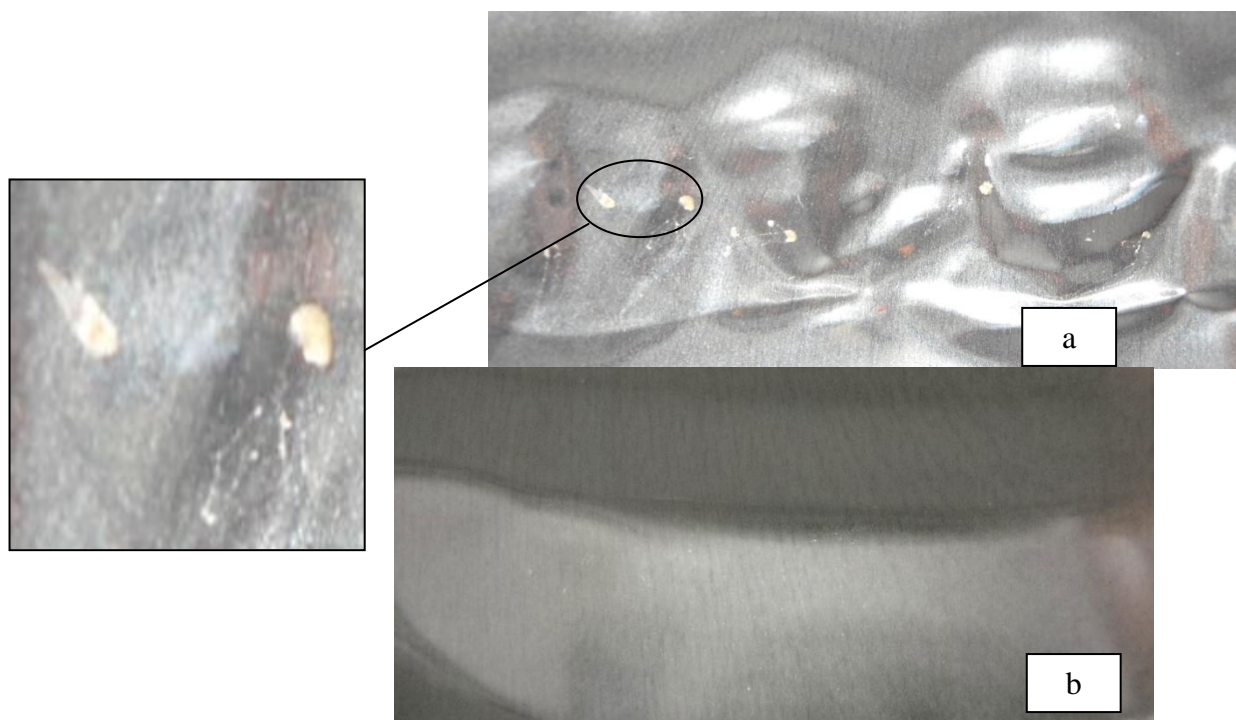


Figura 15: Fotografia do interior da lata amolgada (a) e normal (b) com 299 dias.

A validade do lote L3309092 de cerveja terminava a 30-03-2010, e esta análise foi feita por um período superior à validade da cerveja. A conclusão que se pode tirar é que, se a lata não sofrer danificação física, então a quantidade de ferro na cerveja não atinge o limite recomendado de 0,1 ppm por um período de mais de um ano, especificamente durante 581 dias.

Assim, pelo menos com as latas testadas, quando em bom estado, sem amolgadelas, o valor de ferro não ultrapassa os valores admissíveis e não ocorre o problema mais temido pelos fabricantes: o gosto metálico.

Analisando a Tabela 18 pode-se dizer que, comparando os valores obtidos para as concentrações de ferro nas latas do lote L3317771 com as latas do lote L3309092, nota-se que a concentração de ferro é muito maior nas primeiras. Deste modo, conclui-se que existiu migração do ferro da lata para a cerveja, quando armazenada por mais de 2,3 anos, mas que esta não foi significativa nos primeiros 581 dias. Não se pode no entanto excluir a

hipótese do revestimento usado no interior das latas ter sido diferente nos dois lotes analisados.

De entre as latas do lote L3317771 era de esperar que as latas com 1336 dias de armazenamento tivessem uma concentração maior que a lata desse lote com 839 dias. Tal não se verificou, o que pode indiciar alguma heterogeneidade no revestimento interior das latas deste lote, ou que a heterogeneidade “normal” das latas se acentuou com o tempo, uma vez que esta nunca foi evidente nas análises do lote mais novo.

As concentrações de ferro para as latas do lote L3317771 possuem valores muito acima do limite máximo recomendado, o que implica que a qualidade destas cervejas se alterou significativamente com o tempo.

É durante o armazenamento que a cerveja adquire grande parte do seu sabor, contudo a presença elevada de ferro na cerveja pode prejudicar o seu sabor e provocar um escurecimento ou turvação [19, 39, 40]. Com esta informação e tendo em conta os valores de concentração de ferro elevados observados na Tabela 18, analisou-se a absorvência em função do comprimento de onda para duas alíquotas de cerveja dos diferentes lotes.

Fez-se uma diluição das amostras de cerveja com água Milli- Q de 20 vezes e leu-se a absorvência das amostras de cerveja contra a água Milli-Q. Na Figura 16, podem-se observar os respectivos espectros para a cerveja diluída 20 vezes, das latas do lote L3309092 com 581 dias e do lote L3317771 com 1336 dias.

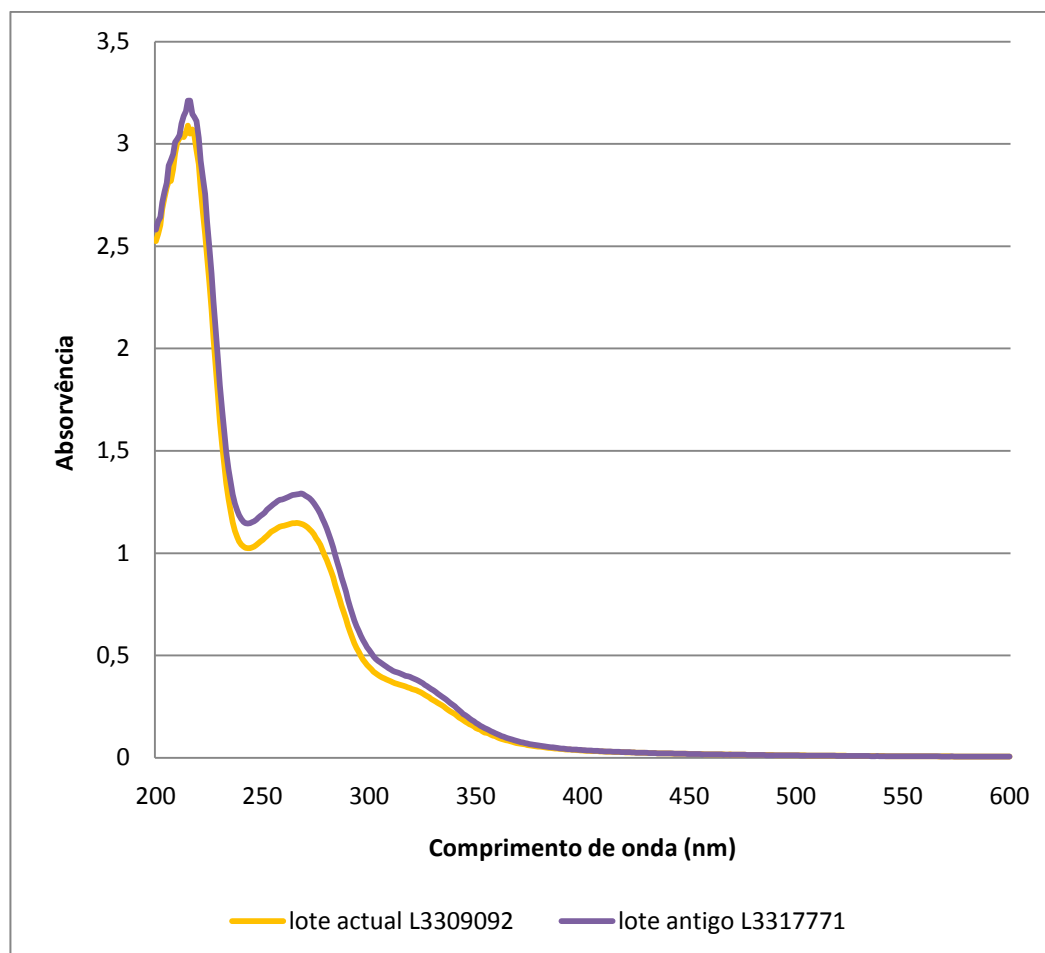


Figura 16: Representação gráfica dos espectros para a cerveja diluída 20 x do lote L3309092 e do lote L3317771.

Na Figura 16 é possível distinguir a cerveja antiga da cerveja actual. Analisando esta figura, conclui-se o esperado, ou seja, a cerveja antiga tem uma coloração mais intensa que a cerveja actual. Esta cor mais intensa na lata do lote L3317771 indicia alterações que poderão estar relacionadas com a migração do ferro para a cerveja.

6.2. Análise do Ferro na Cerveja por Espectroscopia de Absorção Atômica

Na Tabela 19 apresentam-se os valores da concentração de ferro para duas amostras de cerveja (amostra 1 e 2) determinados por três métodos distintos: UV-Vis, FAAS e

GFAAS; onde as amostras para os dois últimos métodos referidos sofreram um pré-tratamento (digestão ácida).

Tabela 19: Tabela resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises: UV-Vis, FAAS e GFAAS.

Amostra	Métodos	Recta de Calibração	R ²	LQ (ppm)	[Fe ²⁺] ± IC (ppm)
1	UV-Vis	$y = 0,2073x + 0,0089$	0,9996	-	$0,047 \pm 0,033$
	FAAS	$y = 0,1783x - 0,0010$	0,9995	0,075	$0,038 \pm 0,012$
	GFAAS	$y = 0,0127x + 0,0127$	0,9537	0,043	$0,050 \pm 0,007$
2	UV-Vis	$y = 0,2038x + 0,0124$	0,9997	-	$0,067 \pm 0,031$
	FAAS	$y = 0,1783x - 0,0010$	0,9995	0,075	$0,046 \pm 0,012$
	GFAAS	$y = 0,0127x + 0,0823$	0,9537	0,042	$0,051 \pm 0,007$

Na Figura 17, apresentam-se para uma fácil visualização e interpretação de resultados, os valores de concentração de ferro e respectivos intervalos de confiança.

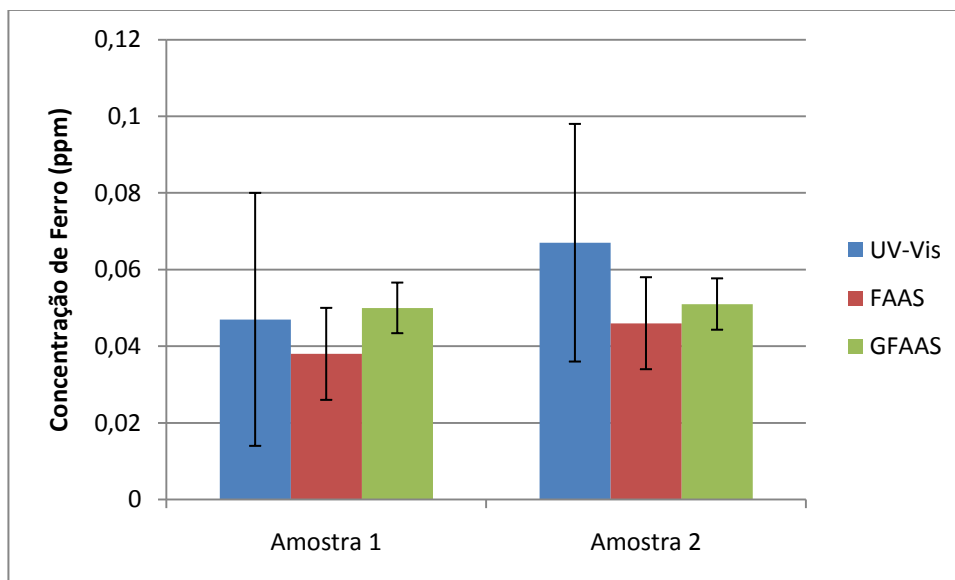


Figura 17: Representação gráfica da concentração de ferro na amostra 1 e 2 de cerveja em três métodos distintos: UV-Vis, FAAS e GFAAS.

Da comparação dos valores de concentração de ferro da Figura 17, pode dizer-se que não há diferenças significativas nos resultados.

O método colorimétrico da o-fenantrolina (UV-Vis) conduz a resultados menos precisos do que os outros dois métodos. É no entanto um método mais rápido em do que os outros dois, tendo em conta que não se tem de fazer uma digestão ácida da amostra.

A FAAS apresenta uma precisão aceitável mas o seu LQ (limite de quantificação) é muito alto para os valores de ferro que se encontram geralmente na cerveja, o que implica a exclusão deste método analítico para estas análises. Outro problema que surgiu neste método foi o sinal do branco ser 84% do sinal da amostra, mais uma razão para se excluir este método.

A análise por GFAAS tem uma boa precisão e apresenta um LQ menor, mas que está no entanto muito próximo da concentração da amostra analisada.

Pode-se fazer a leitura directa da cerveja por GFAAS apenas com uma simples diluição de amostra [18], onde se evita a manipulação da amostra, associado à digestão ácida e à necessidade de grandes quantidades de cerveja (50,00 mL).

Na Tabela 20 podem-se ver os resultados da concentração de ferro obtidos no método UV-Vis e GFAAS sem digestão para 5 amostras diferentes de cerveja.

Tabela 20: Tabela resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises: UV-Vis e GFAAS.

Amostra	Métodos	Recta de Calibração	R ²	LQ (ppm)	[Fe ²⁺] ± IC (ppm)
1	UV-Vis	y = 0,2105x + 0,0721	0,9996	-	0,380 ± 0,039
	GFAAS	y = 0,0069x - 0,0687	0,9658	0,029	0,420 ± 0,006
2	UV-Vis	y = 0,2112x + 0,0308	0,9991	-	0,160 ± 0,054
	GFAAS	y = 0,0069x - 0,0687	0,9658	0,029	0,190 ± 0,007
3	UV-Vis	y = 0,2161x + 0,0945	0,9997	-	0,480 ± 0,035
	GFAAS	y = 0,0069x - 0,0687	0,9658	0,029	0,470 ± 0,006
4	UV-Vis	y = 0,1789x + 0,1387	0,9996	-	0,850 ± 0,074
	GFAAS	y = 0,0069x - 0,0687	0,9658	0,029	0,890 ± 0,008
5	UV-Vis	y = 0,1959x + 0,1315	0,9998	-	0,740 ± 0,042
	GFAAS	y = 0,0069x - 0,0687	0,9658	0,029	0,760 ± 0,007

Na Figura 18 estão representados os valores de concentração de ferro e seus respectivos intervalos de confiança, para uma fácil visualização e interpretação de resultados.

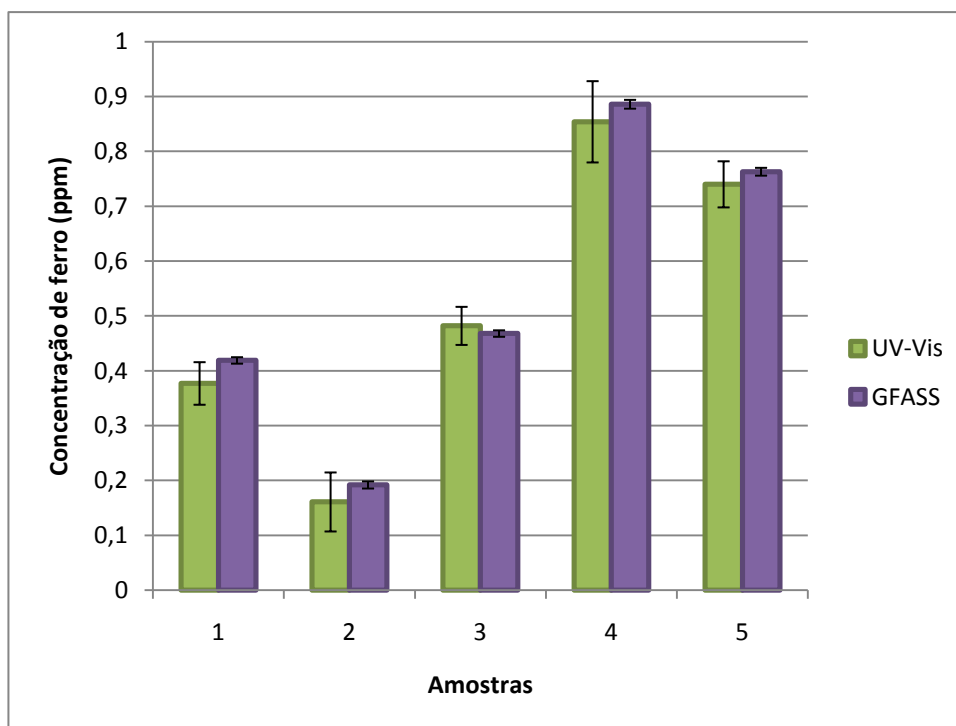


Figura 18: Representação gráfica da concentração de ferro em 5 amostras distintas de cerveja pelo método UV-Vis e GFAAS.

Analisando a Figura 18 pode-se verificar que em qualquer amostra (1 a 5) a concentração de ferro na cerveja obtida por ambos métodos não é significativamente diferente.

No entanto é notória a melhor precisão conseguida com o método de GFAAS comparativamente ao método de UV-Vis.

O limite de quantificação do método GFAAS sem digestão é agora mais adequado para as análises de ferro nestas amostras de cerveja.

Apesar de todas as análises da cerveja do lote L3309092 apresentarem valores abaixo do limite máximo recomendado, a utilização do método de GFAAS sem digestão da

cerveja, poderia ter permitido notar alguma migração do ferro da folha-de-flandres para a cerveja.

7. Conclusão

Nas latas do lote L3309092 não foi possível detectar a migração do ferro das latas normais durante 581 dias, estando os valores de concentração de ferro para estas cervejas abaixo do limite máximo recomendado.

Se as análises da determinação do ferro na cerveja fossem feitas por GFAAS sem digestão da amostra, poderia obter-se melhores precisões e por isso as conclusões da não migração do ferro da folha-de-flandres para a cerveja poderiam ser alteradas.

Nas latas amolgadas do lote L3309092, também não se notou nenhuma migração do ferro para a cerveja ao longo do tempo, com excepção dos dias 299, 580 e 581. A migração do ferro detectada das latas amolgadas, não depende do tempo de armazenamento, mas sim o tipo de danificação feito à folha-de-flandres da lata de cerveja.

Nas latas do lote L3317771, mesmo não sendo amolgadas apresentam valores de concentração de ferro muito elevados relativamente ao limite máximo recomendado, mas isto após 2,3 anos.

Os valores das concentrações de ferro para o lote L3317771 são muito díspares o que mostra a possível heterogeneidade das amostras não sendo de excluir a hipótese do revestimento das latas ser muito diferente do que é utilizado nas latas da actualidade.

8. Referências

- [1] Slater, B., Martins, B. T., Philippi, S. T., “Rótulos e embalagens na indústria de alimentos.”, Brasil Alimentos, 2000, 1: 42-45.
- [2] Santos, R. C., Castro, V. M. F., “Uma proposição sistêmica para o desenvolvimento de embalagens”, RAE – Revista de Administração de Empresas, 1998, 38: 26-35.
- [3] Filho, V. M., “Embalagem Metálica: Avaliação de Folhas-de-Flandres na Fabricação de Latas Expandidas a Partir do Processo Stretching”, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Caetano do Sul (Brasil): 2007.
- [4] Faria, E. V., Freire, C. M. A., Mori, E. E. M., “Avaliação do desempenho de latas de folha-de-flandres por meio da espectroscopia de impedância electroquímica e do acompanhamento da estocagem de palmito pupunha (*Bactris gasipaes*) enlatado”, Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas (Brasil): 2000.
- [5] Brennan, J. G., “Food Processing Handbook”, Wiley-VCH, Germany: 2006.
- [6] Goles, R., McDowell, D., Kirwan, M. J., “Food Packaging Technology”, CRC Press, London: 2003.
- [7] Kasbergen, G. F., “Efeito do tratamento térmico nos fios ortodônticos de aço inoxidável”, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista (Brasil): 2007.
- [8] http://www.lme.com/downloads/metallsspecs/LME_Specification_for_Tin_041108.pdf: acesso em 07 de Outubro de 2010 (BS EN 610:1996).
- [9] Yam, K. L., “Encyclopedia of Packaging Technology”, 3rd Ed., Wiley, USA: 2009.
- [10] Kohman, E. F., Sanborn, N. H., “The Tin-Iron Alloy in Tin Plate”, Industrial And Engineering Chemistry, 1927, 19: 514-518.
- [11] <http://www.infopedia.pt/lingua-portuguesa/>: acesso em 22 de Outubro de 2010.
- [12] Vermaercke, P., Farina, F., Sneyers, L., Bruggeman, M., Bouças, J. G., “Validation of determination of tin by k0-instrumental neutron activation analysis in foodstuff”, J. Radioanal Nucl. Chem., 2009, 281: 35–39.
- [13] Varghese, A., Khadar, A. M. A., “Highly Selective Derivative Spectrophotometric Determination of Tin (II) in Alloy Samples in the Presence of Cetylpyridinium Chloride”, Acta Chim. Slov., 2006, 53: 374-380.
- [14] Shimbo, S., Matsuda-Inoguchi, N., Watanabe, T., Sakurai, K., Date, C., Nishimura, A., Nakatsuka, H., Saito, H., Arisawa, K., Ikeda, M., “Dietary intake of tin in

- Japan, and the effect on intake of canned food and beverage consumption”, *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24: 535–545.
- [15] Stone, I., “Determination of Traces of Tin in Malt Beverages”, *Industrial and Engineering Chemistry*, 1941, 13: 791-792.
- [16] AOAC International, “Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL”, 17th Ed., William Horwitz, Gaithersburg: 2003;
- [17] Pohl, P., “Determination and fractionation of metals in beer: A review”, *Food Additives and Contaminants*, 2008, 25: 693–703.
- [18] Svendsen, R., Lund, W., “Speciation of Cu, Fe and Mn in beer using ion exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with electrothermal atomic absorption spectrometry”, *The Analyst*, 2000, 125: 1933–1937.
- [19] Oñate-jaén, A., Bellido-milla, D., Hernández-artiga, M. P., “Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing”, *Food Chemistry*, 2006, 97: 361–369.
- [20] Matusiewicz, H., Kopras, M., “Methods for Improving the Sensitivity in Atom Trapping Flame Atomic Absorption Spectrometry: Analytical Scheme for the Direct Determination of Trace Elements in Beer”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12: 1287-1291.
- [21] Pohl, P., Prusisz, B., “Chemical fractionation of Cu, Fe and Mn in canned Polish beers”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, 23: 86-94.
- [22] Hug Les, P. S.; Baxter, E. D., “Beer – Quality, Safety and Nutritional Aspects”, *The Royal Society of Chemistry*, Cambridge: 2001.
- [23] União Cervejeira, E.P., “A Cerveja”, *Serviço de Relações Públicas da UNICER, Leça do Balio*: 1993.
- [24] Bamforth, C. W., “Review Brewing and brewing research: past, present and future”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80: 1371-1378.
- [25] Gump, B.H., “Beer and Wine Production – Analysis, Characterization, and Technological Advances”, *American Chemical Society*, Washington: 1993.
- [26] Lea, A., Piggott, J., “Fermented Beverage Production”, *Blackie Academic & Professional*, Glasgow: 1995.

- [27] Filho, J. C. S., Armelin, M. J. A., Silva, A. G., “Determinação da composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal pela técnica de activação neutrônica”, *Pesq. agropec. bras.*, 1999, 34: 235-241.
- [28] National Research Council, “Mineral Tolerance of Domestic Animals”, The National Academies Press, Washington: 1980.
- [29] <http://www.quinuareal.com.br/valor.asp>: acesso em 01 de Outubro de 2010.
- [30] Almeida, C. I. R., “Métodos Espectroscópicos Para o Estudo da Cerveja”, Tese de Mestrado em Química e Qualidade dos Alimentos, Universidade de Aveiro, Departamento de Química: 2006.
- [31] Kishimoto, T., “Hop-derived Odorants Contributing to the Aroma Characteristics of Beer”, Dissertação de Doutorado, Universidade de Kyoto (Japão): 2008.
- [32] Kayodé, A. P. P., Hounhouigan, J. D., Nout, M. J. R., “Impact of brewing process operations on phytate, phenolic compounds and in vitro solubility of iron and zinc in opaque sorghum beer”, *LWT*, 2007, 40: 834–841.
- [33] Cooman, L., Aerts, G., Overmeire, H., “Alterations of the Profiles of Iso- α -Acids During Beer Ageing, Marked Instability of Trans-Iso- α -Acids and Implications for Beer Bitterness Consistency in Relation to Tetrahydroiso- α -Acids”, *Journal of The Institute of Brewing*, 2000, 106: 169-178.
- [34] Blanco, C. A., Caballero, I., Rojas, A., Gomez, M., Alvarez, J. “Chelation of aqueous iron (III) by 2-acetyl-1,3-cyclohexanedione and beer ageing”, *Food Chemistry*, 2003, 81: 561–568.
- [35] Blanco, C. A., Rojas, A., Caballero, P. A., Ronda, F., Gomez, M., Caballero, I., “A better control of beer properties by predicting acidity of hop iso- α -acids”, *Trends in Food Science & Technology*, 2006, 17: 373–377.
- [36] Bellido-Milla, D., Moreno-Perez, J., Hernández-Artiga, M., “Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves”, *Spectrochimica Acta, Part B*, 2000, 55: 855-864.
- [37] Nascentes, C. C., Kamogawa, M. Y., Fernandes, K. G., Arruda, M. A. Z., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A., “Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry”, *Spectrochimica Acta, Part B*, 2005, 60: 749–753.

- [38] Demirel, S., Tuzen, M., Saracog Lu, S., Soylak, M., “Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials”, *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 152: 1020–1026.
- [39] Ibanez, J. G., Carreon-Alvarez, A., Barcena-Soto, M., Casillas, N., “Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis”, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21: 672– 683.
- [40] Kaneda, H., Kano, Y., Koshino, S., Ohyanishiguchi, H., “Behavior and role of iron ions in beer deterioration”, *J. Agricult Food Chem.*, 1992, 40: 2102–2107.
- [41] Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., Stevens, R., “Brewing science and practice”, Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 2004.
- [42] Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G., “The chemistry of beer aging – a critical review”, *Food Chem.*, 2006, 95: 357–381.
- [43] Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., “The prevention of alloxan-induced diabetes in mice by the iron-chelator detapac: Suggestion of a role for iron in the cytotoxic process”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1982, 38: 378-379.
- [44] Matsushige, I., Oliveira, E., “Determination of trace elements in Brazilian beers by ICP-AES”, *Food Chemistry*, 1993, 47: 205-207.
- [45] Matsha, T., Brink, L., Rensburg, S. V., Hon, D., Lombard, C., Erasmus, R., “Home-Brewed Beer Consumption and Iron Status in Patients with Esophageal Cancer and Healthy Control Subjects from Transkei, South Africa”, *Nutrition and Cancer*, 2006, 56: 67–73.
- [46] Moyo, V. M., Gangaidzo, I. T., Gomo, Z. A. R., Khumalo, H., Saungwene, T., Kiire, C. F., Rouault, T., Gordeuk, V. R., “Traditional Beer Consumption and the Iron Status of Spouse Pairs From a Rural Community in Zimbabwe”, *Blood*, 1997, 89: 2159-2166.
- [47] Brown, A. A., Halls, D. J., Taylor, A., “Atomic Spectrometry Update-Clinical Materials, Foods and Beverages”, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1986, 1: 29-42.
- [48] Currel, G., “Analytical Instrumentation Performance Characteristics and Quality”, Wiley, Eng Land: 2000.

- [49] Bellido-Milla, D., Oñate-Jaén, A., Palacios-Santander, J. M., Palacios-Tejero, D., Hernández-Artiga, M., “Beer Digestions for Metal Determination by Atomic Spectrometry and Residual Organic Matter”, *Microchim. Acta*, 2004, 144: 183–190.
- [50] Rothery, E., “Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers”, Varian, Australia: 1988.
- [51] Dean, J. R., “Atomic Absorption and Plasma Spectroscopy”, 2nd Ed., Wiley, Ing Laterra: 1997.
- [52] Gonçalves, M. L. S. S., “Métodos Instrumentais para Análise de Soluções: Análise Quantitativa”, 3^a Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa: 1996.
- [53] Watson, C. A., “Official and Standardized Methods of Analysis”, The Royal Society of Chemistry, 3^a Ed., Cambridge: 1996.
- [54] Ewing, G. W., “Metodos Instrumentales de Analises Quimicos”, McGraw-Hill, México: 1978.
- [55] Mehlig, J. P., Hulett, H. R., “Spectrophotometric Determination of Iron With o-Phenanthroline and with Nitro-o-phenanthroline”, *Industrial and Engineering Chemistry*, 1942, 14: 869-871.
- [56] Schilt, A. A., Hoyle, W. C., “Improved Sensitivity and Selectivity in the Spectrophotometric Determination of Iron by Use of a New Ferri n-Type Reagent” *Analytical Chemistry*, 1967, 39: 114-117.
- [57] Schilt, A. A., “Analytical Application of 1,10-phenanthroline and related compounds”, Pergamon Press, Northern Illinois University: 1969.
- [58] Gaines, A., Hammet, L. P., Walden, G. H., “The Structure and Properties of Mononuclear and Polynuclear Phenanthroline-Ferric Complexes”, *J. Am. Chem.*, 1936, 58: 1668-1674.
- [59] Gray, P. P., Stone, I. M., “Direct Determination of Iron in Malt Beverages”, *Industrial and Engineering Chemistry*, 1938, 10: 415-417.
- [60] Ampan, P., Lapanantnoppakkun, S., Sooksamiti, P., Jakmunee, J., Hartwell, S. K., Jayasvati, S., Christian, G. D., Grudpan, K., “Determination of trace iron in beer using flow injection systems with in-valve column and bead injection”, *Talanta*, 2002, 58: 1327- 1334.

- [61] Clark, L. J., “Iron(II) Determination in the Presence of Iron(III) Using 4,7-Diphenyl-1,10-phenanthroline”, *Analytical Chemistry*, 1962, 34: 348-352.
- [62] Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., “Principios de Análisis instrumental”, McGraw-Hill, 5ª Ed., Madrid: 2001.
- [63] Miller, J. N., Miller, J. C., “Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry”, Prentice Hall, 4ª Ed.: 2000.